

UNIVERSITÉ RENÉ DESCARTES DE PARIS

UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DE BIOLOGIE HUMAINE ET EXPÉRIMENTALE

ANNÉE 1971 - 1972

SÉRIE E N° 243

THÈSE

présentée

A L'UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE DE BIOLOGIE HUMAINE
ET EXPÉRIMENTALE DE L'UNIVERSITÉ RENÉ DESCARTES DE PARIS

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN PHARMACIE

(Diplôme d'État)

par

Jean-Claude TORLOTIN

Pharmacien-Chef du C.H.U. HENRI MONDOR - Créteil

ÉTUDE D'UNE MÉTHODE D'ISOLEMENT DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS PRÉSENT DANS L'URINE UTILISATION DES MEMBRANES FILTRANTES

Soutenue le 17 Décembre 1971

JURY

Mademoiselle S. LAMBIN

Présidente

Messieurs

A. GERMAN

A. DESVIGNES

} Examinateurs

Monsieur

J. BRETEY

Invité

UNIVERSITÉ RENÉ DESCARTES DE PARIS

UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DE BIOLOGIE HUMAINE ET EXPÉRIMENTALE

ANNÉE 1971 - 1972

SÉRIE E N° 243

THÈSE

présentée

A L'UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE DE BIOLOGIE HUMAINE
ET EXPÉRIMENTALE DE L'UNIVERSITÉ RENÉ DESCARTES DE PARIS

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN PHARMACIE

(Diplôme d'État)

par

Jean-Claude TORLOTIN

Pharmacien-Chef du C.H.U. HENRI MONDOR - Créteil

ÉTUDE D'UNE MÉTHODE D'ISOLEMENT DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS PRÉSENT DANS L'URINE UTILISATION DES MEMBRANES FILTRANTES

Soutenue le 17 Décembre 1971

JURY

Mademoiselle S. LAMBIN

Présidente

Messieurs

A. GERMAN

A. DESVIGNES

} Examinateurs

Monsieur

J. BRETEY

Invité



A la mémoire de mon Père,

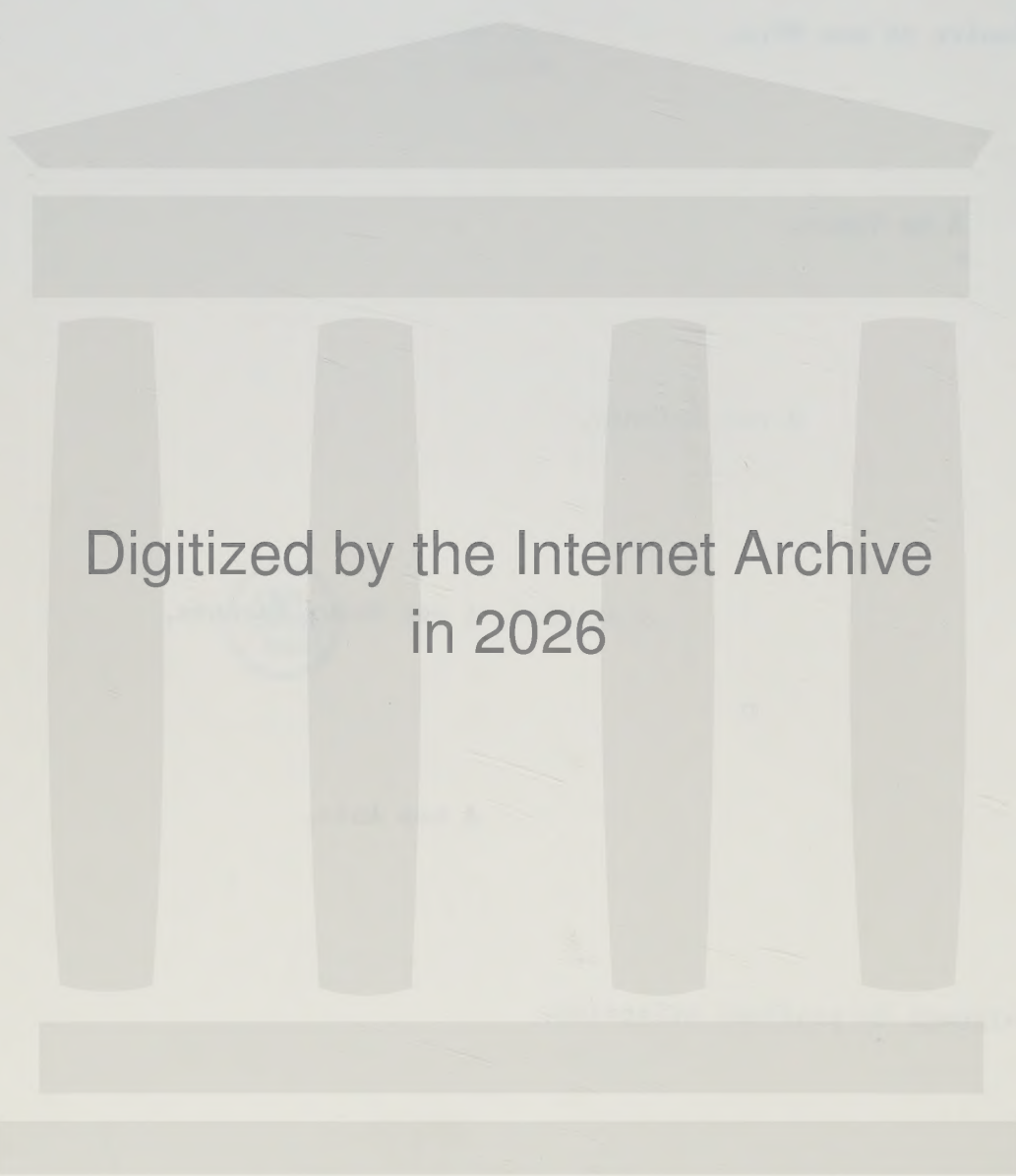
A ma Femme,

A mes Enfants,

A ma Mère, A mes Beaux-Parents,

A mes Amis,

En témoignage de profonde affection.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550410_0033

A MADemoiselle LE PROFESSEUR S. LAMBIN,

Professeur de Microbiologie à l'U.E.R. des Sciences Pharmaceutiques
et Biologiques de l'Université René Descartes

Membre de l'Académie de Pharmacie

qui me fait l'honneur de présider le jury de cette thèse.

En témoignage de ma respectueuse gratitude et de ma profonde
reconnaissance.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR A. GERMAN,.

Professeur de Virologie et d'Immunologie de l'U.E.R. des Sciences
Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université René Descartes

Membre de l'Académie de Pharmacie,

Pharmacien Chef des Hopitaux de Paris,

qui a bien voulu accepter de juger ce travail.

En témoignage de ma très vive reconnaissance et de mon
respectueux dévouement.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR A. DESVIGNES,

Professeur de Cryptogamie et de Microbiologie Industrielle à l'U.E.R.
des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université
René Descartes.

qui a bien voulu nous faire l'honneur d'examiner notre travail.

Qu'il agrée l'expression de notre profonde gratitude.

A MONSIEUR LE DOCTEUR JEAN BRETEY

Chef de Service à l'Institut Pasteur de Paris

Membre de l'Académie Nationale de Médecine

qui nous a accueilli avec bienveillance dans son laboratoire

qui a bien voulu accepter de juger notre travail

Qu'il agrée l'expression de notre profonde reconnaissance

A MESSIEURS CHEYMOL, MANGEOT, PIGNARD et HAZEBOUCQ

Pharmaciens en Chef des Hôpitaux de Paris.

Auprès desquels nous avons toujours trouvé conseils, aide et
compréhension.

A MADAME MARIE-THERESE JAHAN

Chargée de Recherche à l'Institut Pasteur de Paris,

Que nous remercions pour son aide et sa participation à ce travail.

A tous les Membres du Service de Pharmacie et du Laboratoire de Toxicologie du C.H.U. H. Mondor.

ETUDE D'UNE METHODE D'ISOLEMENT

DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

PRESENTS DANS L'URINE.

UTILISATION DES MEMBRANES FILTRANTES.

TABLE DES MATIERES

	Pages
<u>INTRODUCTION</u>	1
<u>CHAPITRE I</u>	
EXPOSES CRITIQUE DES PROCEDES ACTUELLEMENT UTILISES	3
I) - LA SEPARATION DES MYCOBACTERIES	3
II) - LE TRAITEMENT DECONTAMINANT	5
III) - LA CULTURE	7
IV) - IDENTIFICATION DES MYCOBACTERIES ISOLEES	7
<u>CHAPITRE II</u>	
TRAVAUX PERSONNELS	9
I) - UTILISATION D'UNE TECHNIQUE DE FILTRATION SUR MEMBRANE	9
II) - METHODE PERSONNELLE	16
III) - CONSIDERATIONS PRELIMINAIRES A L'EXPOSE DES RESULTATS	20
1°) Milieux de culture	20
2°) Pouvoir pathogène expérimental	20
3°) Coloration de Ziehl	21
4°) Matériel d'étude	21
5°) Sensibilité de la Méthode	22
6°) Rendement du traitement décontaminant	22
<u>CHAPITRE III</u>	
ETUDE CRITIQUE DE NOTRE METHODE	25
I) - IRREGULARITE DE LA BACILLURIE	25
II) - MALADES SOUMIS A UN TRAITEMENT ANTIBACILLAIRE	26
III) - COMPORTEMENT DES BACILLES TUBERCULEUX EXPOSES A L'ACTION DU CETHEXONIUM	28
IV) - VALEUR DE LA FILTRATION SUR MEMBRANE, COMPARATIVEMENT AU PROCEDURE PAR CENTRIFUGATION	28
V) - INTERET DE TROIS MILIEUX A L'OEUF DE COMPOSITION DIFFE- RENTE	

VI) - FACTEURS SUSCEPTIBLES DE CONTRARIER LA PRATIQUE DE LA METHODE PROPOSEE	31
A) L'examen cytologique	31
B) L'examen bactériologique	32
C) Renseignements à attendre de cet examen cytobac- tériologique	32
VII) - TENEUR DE L'INOCULUM EN CETHEXONIUM RESIDUEL	37

CHAPITRE IV

COMPORTEMENT DES BACILLES TUBERCULEUX SOUMIS A L'ACTION DU CETHEXONIUM	44
I) - MESURE DE L'ANHYDRIDE CARBONIQUE PRODUIT PAR DES MYCOBACTERIES EN COURS DE CULTURE	46
II) - INFLUENCE DU CETHEXONIUM RESIDUEL SUR LE DEVELOP- PEMENT DES MYCOBACTERIES	56
III) - INCIDENCE DE L'EXPOSITION DES BACILLES TUBERCULEUX PRESENTS DANS L'URINE A L'EFFET ANTISEPTIQUE DU CETHEXONIUM	61

<u>CONCLUSIONS GENERALES</u>	67
------------------------------	----

<u>INDEX BIBLIOGRAPHIQUE</u>	71
------------------------------	----

La recherche de *Mycobacterium tuberculosis* dans les produits pathologiques a suscité, depuis plus d'une décennie, de nombreux travaux originaux, tant en France qu'à l'étranger. A la suite de ces études, les dogmes bien établis, et jusqu'alors scrupuleusement respectés, qui régissaient les domaines aussi variés que la coloration, la culture ou le pouvoir pathogène expérimental, furent tour à tour amendés, puis révisés.

La bactériologie du bacille tuberculeux, identifié par R. KOCH voici près de 100 ans, n'avait, il est vrai, guère évolué et ZIEHL, PETROFF, puis LOEWENSTEIN, semblaient avoir décrit des moyens efficaces permettant de détecter ce germe singulier.

En réalité, seule la forme pulmonaire de l'infection, principale responsable de la morbidité tuberculeuse, connaît la sollicitude des bactériologistes, et il n'est que de consulter les traités pour constater que la bactériologie de l'expectoration tient lieu de modèle.

La recherche des bacilles tuberculeux dans l'urine nous ayant semblé devoir bénéficier d'un protocole spécial, nous nous sommes attachés à en reconsidérer les conditions d'isolement compte tenu des considérations suivantes.

L'affirmation bactériologique d'une bacillurie ne se conçoit plus, dans l'état actuel de nos connaissances, que par la mise en évidence des caractères cultureux et biologiques du *Mycobacterium* et de son pouvoir pathogène. Les seuls critères morphologiques ou tinctoriaux se révèlent, à l'usage, nettement insuffisants. (55)

Par ailleurs, la mise en évidence par culture ou inoculation au cobaye apparaît encore pour le moins hasardeuse et peu sûre : moins de 40 % des sujets atteints d'une infection tuberculeuse confirmée de l'arbre urinaire offrent en effet une bactériologie positive. (11 - 14 - 42 - 58)

De son côté, l'examen radiologique est également peu sensible et ne permet de déceler visuellement l'affection qu'à un stade avancé, d'où la mise en oeuvre de techniques coûteuses, délicates et peu répandues, telle la néphrographie isotopique qui peut permettre le diagnostic de la lésion à un stade bien plus précoce. (25)

Les travaux récents des épidémiologistes concordent pour reconnaître que si la mortalité tuberculeuse a considérablement décru depuis l'introduction des antibacillaires majeurs, la morbidité, en revanche, demeure préoccupante.

Le caractère insidieux de la forme rénale, évoluant d'une manière asymptomatique (42 - 72), explique que sa découverte soit, le plus souvent, très tardive, et ^{parfois} ~~parfois~~ ^{parfois} ~~seulement~~ que post-mortem. (49)

La dénomination de "tuberculose rénale" est impropre puisqu'il s'agit en réalité d'une tuberculose pouvant frapper l'arbre urinaire à tous ses étages, simultanément même, l'ensemencement se faisant par dissémination hémotogène : si nous reprenons cette dénomination, ce ne sera que par commodité d'écriture.

Le risque d'apparition de cette forme croît singulièrement avec l'âge (48 - 76) et les récurrences de tuberculose en général affectent plus particulièrement l'arbre urinaire et n'apparaissent dans 50 % des cas que 6 à 9 ans après le début de la primo-infection. (60 - 84)

L'incidence pratique et économique de la mise en évidence de telles lésions ne peut être mésestimée d'autant qu'en France le biologiste est désormais tenu (Journal officiel du 6 août 1966) de rechercher systématiquement le bacille tuberculeux dans les urines en présence de toute pyurie importante ou persistante.

Pour toutes ces raisons, la mise en oeuvre d'une méthode d'exécution aisée, sûre et sensible ne pourrait que favoriser la découverte d'une bacillurie à un stade précoce et satisfaire le triple aspect bactériologique, épidémiologique et économique.

CHAPITRE I

EXPOSE CRITIQUE DES PROCEDES ACTUELLEMENT UTILISES

En ce qui concerne plus particulièrement l'urine, quatre étapes successives sont à envisager :

I) - LA SEPARATION DES MYCOBACTERIES

II) - LE TRAITEMENT DECONTAMINANT

III) - LA MISE EN CULTURE ET, EVENTUELLEMENT, L'INOCULATION AU COBAYE

IV) - L'IDENTIFICATION DES MYCOBACTERIES ISOLEES

I) - LA SEPARATION DES MYCOBACTERIES

Les conditions de récolte de l'échantillon constituent une première difficulté.

Pendant longtemps, la coutume a été en effet d'utiliser une partie aliquote du volume total émis en 24 heures en vue de compenser l'irrégularité éventuelle de la bacillurie ou la pauvreté en germes. Cette manière de procéder entraîne un certain nombre d'inconvénients :

- nécessité de réfrigérer les urines
- contamination microbienne fréquente
- difficulté matérielle de récolte chez les sujets menant une vie active.

En fait, l'objection majeure tient en ce qu'il est prouvé que le séjour du Mycobacterium dans l'urine altère grandement sa vitalité, la perte pouvant atteindre 40 % au bout de 6 heures. (9) Il semble, en définitive, que les conditions soient plus favorables lorsqu'on s'adresse à un échantillon émis au réveil. (39)

L'isolement proprement dit des bacilles fait intervenir des procédés physiques dont le plus courant (et le premier proposé) demeure la centrifugation. (20)

Nous citerons pour mémoire, la flottation au moyen de ligroïne proposée au début de ce siècle, et le moussage décrit par A. DOGNON, il y a près de 30 ans. (17) Ce dernier procédé, peu onéreux et séduisant dans son principe, n'a guère été appliqué au domaine qui nous intéresse présentement. (18) Il se révèle, à l'usage, laborieux et délicat.

Néanmoins, dans certaines circonstances, la méthode des mousses apparaît intéressante, et en 1966, des auteurs américains ont décrit un protocole applicable à l'eau permettant d'isoler *Escherichia Coli*. (29)

La comparaison des différentes techniques mettant en jeu la centrifugation, fait apparaître de profondes divergences quant au temps et à la vitesse de rotation adoptés par les différents auteurs.

Les données réunies dans le TABLEAU N° 1 illustrent cette constatation.

TABLEAU N° 1
MODALITES DE CENTRIFUGATION

AUTEURS	CENTRIFUGATION	
	Vitesse en t/minute	Temps en minutes
BETHOUART J. (3)	6.000	30
DUMAS J. (20)	3.000	60
GODFREY R.L. (28)	3.000	10
ST. HILL C.A. (58)	2.000	30
TACQUET A. (63)	3.000	30
VIALLIER J. (78)	6.000	10, 2 fois

La centrifugation de l'urine a pour objet de séparer au moyen d'une accélération puissante le plus grand nombre de germes en suspension, mais, dans le même temps, ce procédé se révèle ~~élastique~~ ^{spécifique} puisque COLETSSOS a démontré qu'après 15 minutes à 7.000 t/min., on ne pouvait isoler plus de 60 % des bacilles soumis à centrifugation. Ceci signifie que ces bacilles sont seuls encore viables et susceptibles de se développer sur milieux solides. (9)

Si l'on diminue la vitesse de centrifugation la sédimentation demeure incomplète. Par conséquent, quelle que soit l'attitude du bactériologiste en présence d'une suspension paucimicrobienne, le rendement de ce procédé apparaît défavorable.

Aussi, est-ce avec intérêt que nous avons recherché dans la littérature l'utilisation d'une technique de filtration dans ce domaine de recherche du bacille tuberculeux, procédé qui ne peut encourir les mêmes reproches.

H.F.F. FLASCHKE (5) utilise la filtration dans le but de rechercher les bacilles après coloration, et L.G. WAYNE (80), pour en montrer l'efficacité s'adresse à des suspensions réalisées artificiellement à partir de souches de collection. Seul, L.D. HALEY (31) préconise une méthode qui associe la centrifugation à la filtration. La filtration seule n'est pas pratiquée car cet auteur utilise une solution alcaline pour décontaminer l'échantillon ce qui le conduit à centrifuger pour obtenir ensuite une neutralisation homogène de l'échantillon.

En première analyse, nous retiendrons donc que dans le cas particulier des urines, l'isolement du bacille tuberculeux ne bénéficie pas d'un protocole particulier.

II) - LE TRAITEMENT DECONTAMINANT

La culture des mycobactéries, à partir d'un échantillon suspect, ne se conçoit qu'après l'application d'un traitement spécifique, dit "décontaminant", destiné à détruire la flore banale tout en respectant l'intégrité vitale de la mycobactérie.

Un nouveau compromis apparaît donc, et l'impératif est d'autant plus difficile à concilier que les urines, lors d'une infection, présentent de bonnes conditions de culture où il n'est pas rare de compter, à l'émission, plus de 10^5 germes/ml, alors que l'élimination bacillaire est pauvre, de l'ordre de 1 à 10 mycobactéries/ml. —

En général, ce traitement particulièrement énergique (de par la concentration et la durée d'action du décontaminant) ne laissera subsister que fort peu de bacilles tuberculeux viables, bacilles déjà affaiblis par la centrifugation préalable.

Les données du TABLEAU N° 2 fournissent un aperçu des divers procédés les plus couramment utilisés, pour réaliser cette décontamination.

TABLEAU N° 2

PROCEDES ACTUELS D'EPURATION DES PRODUITS PATHOLOGIQUES.

AUTEURS	NATURE DU DECONTAMINANT	DUREE à 37° en minutes	NEUTRALISATION PAR
BETHOUART J. (3)	Mélange d'ammoniums quaternaires en solution aqueuse à 2 %	60 x 2	Eau distillée et centrifugation
DUMAS J. (20)	Solution aqueuse d'Hydroxyde de sodium à 4 %	30 à 60	Solution aqueuse d'acide sulfurique à 15 % puis 4 %
GODFREY R.L. (28)	Solution aqueuse d'Hydroxyde de sodium à 4 %	30 à 60	Solution aqueuse d'acide oxalique à 5 %
NELLES A. (53)	Solution aqueuse de diisobutyl-naphtalène de sodium à 5 %	60 x 2	Eau distillée et centrifugation
ST HILL C.A. (58)	Solution aqueuse d'Hydroxyde de sodium à 20 %	30	Solution aqueuse d'acide chlorhydrique à 50 %
SIKAND R. (61)	Solution aqueuse de Bromure Tetradonium à 1/2000	30	Centrifugation
TACQUET A. (63)	Solution alcaline de Laurylsulfate de sodium à 3 %	40	Solution aqueuse d'acide phosphorique à 0,15 % et centrifugation
VIALLIER J. (78)	Solution aqueuse de Bromure céthylammonium à 1/2000	75	Centrifugation
WAYNE L.G. (81)	Solution aqueuse de chlorure de Benzalkonium à 1/2000	30	Eau distillée et centrifugation

A la lecture de ce tableau, nous pouvons noter que les travaux les plus récents portent sur l'utilisation des tensio-actifs de synthèse dont la nocivité vis-à-vis du bacille tuberculeux est plus ou moins marquée. (63)

Pour sa part, le traitement par l'hydroxyde de sodium ne laisserait subsister que 10 % de survivants après 30 minutes à 37°. (9)

Les conditions optimales pour déceler avec succès une bacillurie n'apparaissent guère favorables et ceci peut expliquer, dans une certaine mesure, les divergences fréquentes entre les observations cliniques et les résultats souvent décevants de l'examen bactériologique.

III) - LA CULTURE

En France, tout au moins, les milieux solides à base d'oeufs ont toujours eu la faveur des bactériologistes qui leur reconnaissent d'indéniables qualités de sensibilité et de fidélité lors de la primoculture.

D'importantes monographies leur ont été par ailleurs consacrées (12 - 46) car, depuis la première préparation formulée par DORSET, de nombreuses variantes ont été proposées qui améliorent la sensibilité des milieux et inhibent plus ou moins le développement des contaminants usuels. (30 - 35 - 10)

M.S. TARSHIS (65) a rappelé en 1951 la possibilité de culture sur milieu gélosé au sang, possibilité qui présenterait l'avantage de réduire le délai d'apparition des colonies. (80)

IV) - IDENTIFICATION DES MYCOBACTERIES ISOLEES

Pendant longtemps, une classification empirique mais simplifiée ne tenant compte que de la seule activité pathogène distingua les mycobactéries tuberculeuses virulentes des mycobactéries supposées saprophytes, dénuées de pouvoir pathogène expérimental sur les animaux de laboratoire, en particulier vis-à-vis du cobaye. Ces mycobactéries saprophytes qualifiées d'atypiques étaient considérées comme des contaminants banaux.

Or, dans le même temps où, grâce à des mesures préventives et curatives spécifiques, la tuberculose régressait heureusement dans tous les pays à haut niveau d'hygiène, apparut une entité pathologique nouvelle, bien qu'incomparablement plus rare connue désormais sous le nom de : mycobactériose..

Les agents de ces infections humaines, apparentes ou non, que la bactériologie ou l'épidémiologie séparaient nettement de la tuberculose, n'ont cessé d'intriguer les bactériologistes qui s'intéressaient au ^{genre}~~genre~~ Mycobacterium. (7 - 26 - 64 - 82)

Avec l'introduction en thérapeutique de l'isoniazide (1952) et l'appréciation de la sensibilité des mycobactéries aux divers médicaments spécifiques, commença à s'affirmer l'intérêt de préciser la position taxonomique des diverses mycobactéries pour peu qu'elles ne répondent pas aux caractères culturels habituels.

P. HAUDUROY (33) plaida ainsi, en 1966, en faveur d'une révision complète de la classification du ^{genre}~~genre~~ Mycobacterium.

A côté des bacilles tuberculeux authentiques à croissance lente, virulents pour le cobaye lorsqu'ils appartiennent à la variété humaine et bovine, les bactériologistes en sont venus à étudier le comportement des mycobactéries à croissance plus rapide, régulièrement isolées au cours d'infections présentant, coïncidence troublante, presque toujours les mêmes caractères anatomo-pathologiques que la tuberculose.

En réalité, cette identification bactériologique précise n'est pas sans se heurter à de grandes difficultés et nécessite l'étude de nombreux caractères tant culturels (rapidité de croissance, aspect des colonies), que biochimiques et sérologiques. L'étude de près de 40 caractères a été ainsi proposée afin d'orienter le diagnostic d'espèce. (13 - 54 - 57 - 70)

Cependant l'absence d'un Centre International de référence est en réalité durement ressentie, car la multitude des tests d'identification proposés a entraîné la découverte d'un grand nombre de mycobactéries apparemment nouvelles, ne différant les unes des autres que par des propriétés contingentes et de surcroît variables.

En ce qui nous concerne, nous pouvons donc prévoir, eu égard à l'extrême ubiquité des mycobactéries "atypiques", leur apparition en culture, ce qui, outre les difficultés d'identification en résultant, posera le problème de leur rôle pathogène.

CHAPITRE II

TRAVAUX PERSONNELS

Ayant considéré l'ensemble des faits énoncés précédemment, il nous est apparu opportun de reconsidérer tous les moyens à mettre en oeuvre pour déceler une bacillurie à *Mycobacterium tuberculosis*.

En particulier, la très faible teneur en bacilles, et leur relative fragilité dans l'urine, nous ont incité à envisager une méthode réalisant simultanément la séparation des mycobactéries et la décontamination. Nous avons ainsi expérimenté une méthode de filtration des urines préalablement traitées par un tensio-actif de la classe des ammoniums quaternaires : le bromure de céthyl-diméthyl (hydroxy-2 cyclohexyl) ammonium ou Céthéxonium.

I) - UTILISATION D'UNE TECHNIQUE DE FILTRATION SUR MEMBRANE

1 - LA FILTRATION SUR MEMBRANE DE L'URINE DECONTAMINEE

Dans ce procédé physique, on utilise les propriétés filtrantes de disques en cellulose ou esters de cellulose.

Proposées dès 1918 en Allemagne par R. ZSIGMONDY (85), ces membranes n'y connurent une fabrication réellement industrielle qu'au cours de la seconde guerre mondiale, dans un but de surveillance bactériologique des eaux.

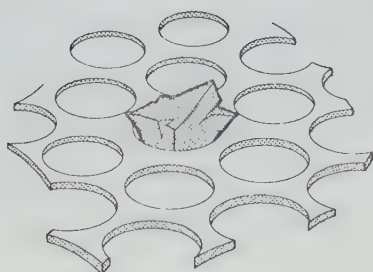
Depuis une dizaine d'années, leur diffusion est assurée régulièrement en France et leur champ d'application ne cesse de croître dans les domaines les plus divers.

En bactériologie, elles offrent un grand intérêt, tant dans la détection des germes (22), que dans la préparation de solutions stériles, contrôle de stérilité (73) ou dans l'étude de l'activité bactéricide des substances solubles. (43)

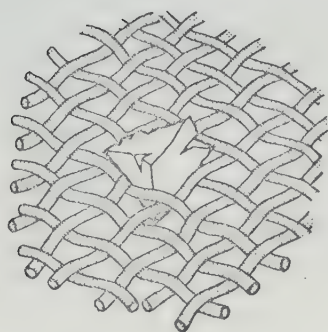
Alors que les filtres en profondeur (plaques d'amiante, bougies de porcelaine...) retiennent avec plus ou moins d'efficacité les particules par absorption, tout au long de leur migration dans le matériau considéré, le mécanisme est totalement différent en ce qui concerne les filtres-écran ou membranes filtrantes.

Ce sont des tamis microporeux, résistants à de fortes pressions, percés de millions de pores régulièrement espacés au centimètre carré, d'une très grande uniformité, les pores pouvant occuper jusqu'à 84 % de la surface. Il en résulte une rétention absolue de surface et une très grande efficacité.

Les schémas suivants illustrent ces propriétés :



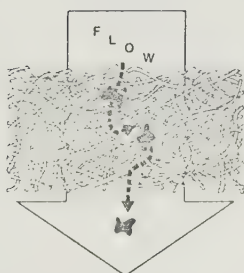
Coupe schématique d'un MF, montrant la rétention des particules à la surface du filtre.



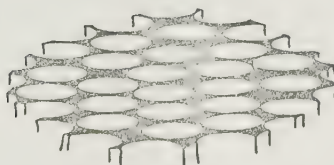
Les filtres écrans sont composés de trames continues de matériaux tels que métal, plastique, fils métalliques ou textiles tissés, avec des pores extrêmement uniformes et régulièrement espacés.



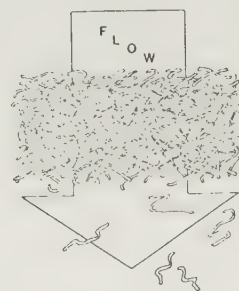
La pression est sans effets sur la structure des pores d'un filtre Millipore. Les pollutions plus grandes que la taille des pores ne pénétreront pas dans la membrane, même en cas de fortes pressions différentielles.



Les particules pénétrant dans un filtre en profondeur s'arrêtent au point où la résistance rencontrée est égale à la force motrice. Toute augmentation ultérieure de la pression les entrainera plus profondément, parfois même leur fera traverser le filtre.



Ce schéma montre approximativement le grand volume des pores (80 %) du MF, comparé à la matière solide (20 %).



Les filtres en profondeur présentent toujours une tendance à la migration. C'est une des caractéristiques de tout filtre en profondeur que de lâcher fibres, particules ou fragments tout au long d'une filtration.

Parmi les autres propriétés également intéressantes de ces membranes nous citerons :

- Leur pureté chimique : l'inertie biologique des esters de cellulose est bien connue et garantit l'absence d'inter-actions néfastes. La culture microbienne pourra donc se poursuivre en leur présence, les germes retenus à la surface de telles membranes ne subissant aucune altération, du moins tant que la filtration intéresse un liquide.

- Leur résistance autorise enfin l'application courante de fortes pressions différentielles et leur stérilisation à l'autoclave. En outre, leur manipulation est aisée.

Compte tenu des caractéristiques morphologiques des bacilles tuberculeux et de la nature du liquide biologique envisagé, nous avons retenu pour nos travaux une membrane présentant les caractéristiques suivantes :

Type [⌘]	H A	
Dimensions des pores	:	0,45 mμ ± 0,02 mμ
Epaisseur	:	150 mμ
Porosité	:	79 %
Débit (1)	:	64
Résistance à la chaleur	:	125°
Point de bulle (2)	:	2,25 bars

(1) Débit : millilitres d'eau distillée par minute et par cm² de surface filtrante, pour une pression de 70 cm de Hg à 25°

(2) Pression en bars, nécessaire au passage de l'air à travers les pores d'un filtre imbibé d'eau.

⌘ Marque déposée par MILLIPORE S.A.

2 - LE TRAITEMENT DECONTAMINANT

Nous avons déjà souligné l'intérêt porté récemment aux tensio-actifs par un certain nombre d'auteurs qui se plaisent à en reconnaître la faible nocivité vis-à-vis du bacille tuberculeux.

Les tensio-actifs possèdent à la fois dans leur molécule des groupements polaires hydrophiles et hydrophobes. Cette constitution leur confère la possibilité de s'accumuler au niveau des surfaces ou interfaces (d'où le nom de "surfactifs" proposé par une commission de normalisation). En servant de liaison entre les deux phases, ils agissent par abaissement de la tension superficielle à l'interface.

La cellule bactérienne, qui est de type proto-caryote, c'est-à-dire sans véritable noyau, possède une membrane cytoplasmique limitant extérieurement le cytoplasme. Cette membrane constituée selon un arrangement ordonné, de phospholipides et de protéines, règle la perméation des métabolites. Mais, en outre, à cette membrane est dévolu un rôle primordial dans la respiration cellulaire. En particulier, on y rencontre les enzymes du cycle tricarboxylique au niveau desquels s'opère la phosphorylation oxydative. Une enveloppe plus externe, ou paroi cellulaire vient parfaire la résistance de la cellule, lui confère une morphologie et des propriétés tinctoriales propres. Sa teneur en lipides variable selon les espèces, mais particulièrement abondante chez les mycobactéries, rend compte de l'activité des surfactifs qui contracteront par là même des liaisons par leurs groupements hydrophobes.

On constate que l'action des surfactifs se manifeste rapidement, sans phase de latence, en privant la cellule de ses ressources, par perte de ses acides aminés, en bloquant la glycolyse ou encore, en altérant le processus respiratoire. (40)

Parmi les milliers de surfactifs connus, une classification s'impose et l'on a coutume de distinguer :

- les surfactifs anioniques
- les surfactifs cationiques
- les surfactifs non ioniques

Nous emprunterons à R.R. DURAND (2) le TABLEAU N° 3 concernant cette classification.

TABLEAU N° 3

CLASSIFICATION DES SURFACTIFS.

	
anioniques	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{CO}_2\text{NA}$ $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{O}-\text{SO}_3\text{NA}$ $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}-\text{SO}_3\text{NA}$ $\text{CH}_3-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{SO}_3\text{NA}$
non ioniques	$\text{CH}_3-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{O}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$ $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{O}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$
cationiques	$\left[\begin{array}{c} \text{R}'' \\ \\ \text{R}-\text{N}-\text{R}'' \\ \\ \text{R}' \end{array} \right]^+ \text{X}^-$
	palmitate de sodium (savon) myristylsulfate de sodium myristylsulfonate de sodium « dodécyl » benzène-sulfonate de sodium (Alcoylarylsulfonate) « nonyl » phénolpolyéthoxylé alcool polyéthoxylé sel d'ammonium quaternaire

1°) Les surfactifs anioniques

Une étude préliminaire portant en particulier sur le laurylsulfate de sodium nous a convaincu de leur faible efficacité vis-à-vis des bactéries Gram négatif, car, dès élimination du détergent, la multiplication reprend, à moins de renforcer son action au moyen d'hydroxyde de sodium. (63) Or, précisément, ce sont ces espèces qui contaminent le plus fréquemment les urines, d'une manière fortuite ou pathologique. Aussi, devant le nombre élevé de cultures contaminées et ininterprétables, avons-nous renoncé à utiliser ces produits.

2°) Les surfactifs cationiques

Alors que les précédents ont surtout été retenus pour leur propriété tensio-active, détergente, ceux-ci présentent un grand intérêt de par leur pouvoir antiseptique très étendu. Ils sont, en effet, utilisés à doses minimales (1 à 2 ‰) dans la désinfection du matériel, dans l'industrie alimentaire et en thérapeutique humaine sous forme de solutions à usage externe et de pommades.

Le seul rapport certain entre la structure chimique et le pouvoir antiseptique réside dans la longueur de la chaîne carbonée, fixée à l'azote quaternaire, qui n'est pas indifférente.

L'activité optimale est ainsi observée lorsque cette chaîne compte 16 atomes de carbone, c'est-à-dire un radical CETHYL.

En outre, leurs propriétés antibactériennes sont plus marquées lorsque le milieu présente un pH acide (celui de l'urine à l'émission est compris, normalement entre 5 et 6) ; si les cations divalents (Ca - Mg) contrarient leurs propriétés, on peut espérer que la présence concomitante de phosphates contrebalance efficacement cet effet. (27)

En réalité, seules de rares espèces microbiennes offrent une résistance remarquable aux surfactifs cationiques : levures, bactéries sporulées et mycobactéries, cette originalité s'expliquant par la constitution chimique particulière de leur paroi, ainsi en ce qui concerne les mycobactéries par la présence d'une coque circuse inerte.

En exploitant cette différence fondamentale de comportement vis-à-vis de l'action des surfactifs cationiques, nous avons pensé devoir enregistrer des résultats favorables dans la découverte d'une bacillurie ; levures et bactéries sporulées n'étant, dans les urines, qu'exceptionnellement rencontrées.

3°) Les surfactifs non ioniques

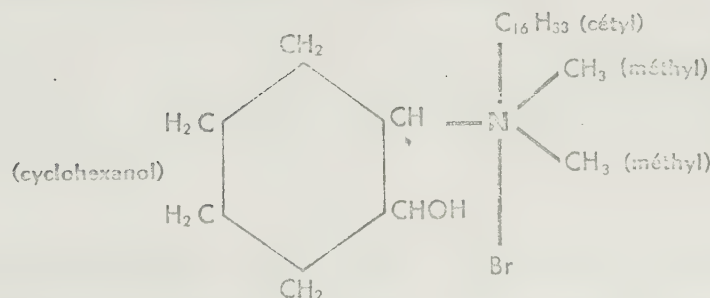
Pratiquement atoxiques pour les bactéries, ils sont même parfois métabolisés par celles-ci. Ainsi le TWEEN 80 facilite le développement du bacille tuberculeux.

Notre choix s'est porté sur le CETHEXONIUM ou céthyl-diméthyl (hydroxy-2 cyclohexyl) ammonium.

La formule développée de ce produit est la suivante.

TABIEAU N° 4

FORMULE DU CETHEXONIUM



L'examen du spectre antibactérien de ce produit, antérieurement établi, (TABLEAU N° 5), nous permet de constater que le pouvoir bactéricide du Céthéxonium s'exerce à des concentrations très faibles, de l'ordre de 10 mcg/ml, vis-à-vis des bactéries Gram +, et à des concentrations sensiblement plus élevées vis-à-vis des bactéries Gram -.

TABLEAU N° 5

ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DU CETHEXONIUM

Micro-organismes	Nombre de souches étudiées	CMI en mcg/ml		CMB en mcg/ml	
		Valeurs extrêmes	Moyenne	Valeurs extrêmes	Moyenne
Streptococcus pyogenes	5	0,4 - 1,56	0,94	1,56 - 3,125	2,18
Streptococcus non hémolytiques	4	1,56 - 3,125	2,73	1,56 - 3,125	2,73
Enterococcus	7	0,4 - 6,25	2,51	3,125 - 12,5	7,14
Staphylococcus aureus	63	0,1 - 1,56	0,74	0,4 - 12,5	3,68
Staphylococcus albus	9	0,4 - 1,56	0,79	0,8 - 12,5	4,86
Sarcina lutea	1	0,2	—	0,2	—
Pasteurella	4	3,125 - 8	5,34	3,125 - 8	6,34
Escherichia coli	33	8 - 62,5	23,91	15,6 - 250	106,53
Citrobacter	6	62,5 - 500	197,91	125 - 500	333
Klebsiella pneumoniae	8	4 - 62,5	20,57	8 - 500	96,7
Proteus	9	8 - 62,5	22,65	15,6 - 500	161,45
Salmonella	10	8 - 250	195,3	15,6 - 500	298,4
Shigella	4	4 - 8	6	4 - 15,6	7,90
Serratia	1	125	—	500	—
Pseudomonas	10	15,6 - 1000	417,18	15,6 - > 1000	> 481
Vibrio	4	4 - 8	7	4 - 8	7
Moraxella	1	31,25	—	31,25	—
Bacillus (subtilis cereus)	8	0,8 - 3,125	1,66	3,125 - 12,5	5,66
Listeria monocytogenes	1	0,4	—	3,125	—
Corynebacterium diphtheriae	3	0,4	0,4	0,4 - 12,5	4,82
Corynebacterium pseudo diphtheriae	8	0,4 - 3,125	1,90	3,125 - 6,25	5,08

C.M.I. : Concentration minimale inhibitrice

C.M.B. : Concentration minimale bactéricide

Parmi ces bactéries, une seule espèce retiendra notre attention : Pseudomonas aeruginosa, dont la présence dans les urines est loin d'être exceptionnelle, du moins en milieu hospitalier.

Aussi, avons-nous décidé de préciser l'activité du Céthéxonium vis-à-vis de cette espèce bactérienne dans les conditions mêmes de l'utilisation.

Pour ce faire, nous avons retenu dix urines présentant à l'émission de 5×10^4 à 1×10^6 Pseudomonas aeruginosa par ml.

Ces suspensions naturelles de germes, réparties sous un volume de 9 ml, ont reçu 1 ml de solutions stériles de Céthéxonium, de manière à présenter des concentrations finales allant de 100 à 2000 mcg/ml.

Les suspensions furent placées à 37°, pendant 30 minutes, puis la bactéricidie déterminée par transfert de 0,1 ml du contenu de chaque tube dans 9 ml de milieu au thioglycolate[¶]. Les tubes de subculture furent maintenus pendant 7 jours à 37° avant lecture.

Dans ces conditions, la concentration minimale bactéricide (C.M.B.) fut reconnue inférieure à 200 mcg/ml pour 2 souches,
comprise entre 200 et 500 mcg/ml pour 5 souches,
comprise entre 800 et 1000 mcg/ml pour 2 souches,
comprise entre 1500 et 1800 mcg/ml pour 1 souche.

Cet essai préliminaire nous a apporté d'utiles renseignements sur le comportement de cette espèce microbienne particulièrement résistante aux ammoniums quaternaires, et nous a permis de fixer une concentration en Céthéxonium susceptible d'assurer une marge satisfaisante de sécurité (à 5000mcg/ml).

II) - METHODE PERSONNELLE

1 - LE MATERIEL (figure 1)

- comprend :
- une trompe à vide
 - une fiole à vide de 250 ml
 - un Büchner, une embase en verre fritté
 - une pince de serrage et un bouchon en néoprène
 - des membranes filtrantes, stérilisées par autoclavage
 - diamètre : 47 mm
 - porosité : 0,45 μ
 - une pince brucelles
 - des boîtes de Pétri stériles, (diamètre 90 mm)
 - des erlenmeyers de 50 ml, stériles
 - une spatule de platine irridié, montée sur manche bactériologique
 - largeur : 3 mm
 - longueur : 4 mm

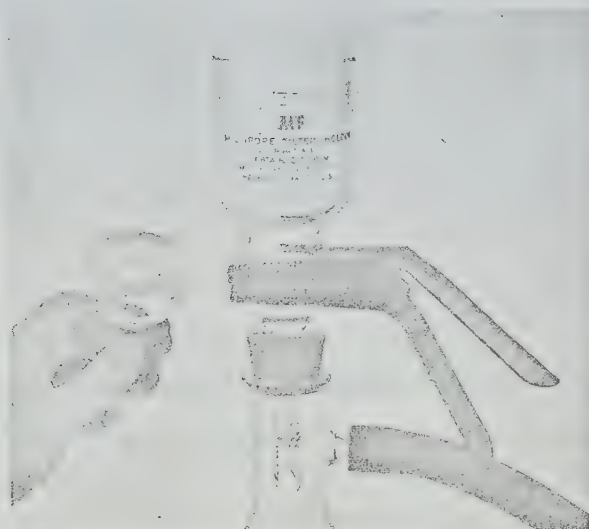


Figure 1



Figure 2 - Un couvercle muni d'un orifice doit être placé sur l'entonnoir au moment du passage à l'autoclave d'un ensemble support de filtre et filtre, afin d'éviter d'endommager le MF.

Figure 1 : Matériel de Filtration

REACTIFS ET MILIEUX DE CULTURE

- eau distillée stérile
- Céthéxonium en solution aqueuse stérile à 5 %
- milieu de Roumans
- milieux de LOEWENSTEIN, JENSEN, COLETOS B et B0

2 - MODE OPERATOIRE

Les urines de la nuit sont recueillies le matin dans un flacon stérile, après toilette soignée, le sujet étant à la diète hydrique depuis la veille au soir. En fait, l'urine n'est recueillie qu'après élimination du premier jet. Chez la femme, une leucorrhée importante nécessite un sondage.

DECONTAMINATION

Connaissant la susceptibilité du bacille tuberculeux aux composants normaux de l'urine, on veillera à en entreprendre la recherche sans délai. A cet effet, 50 ml d'urine, convenablement homogénéisée par retournement du flacon une dizaine de fois, sont introduits dans un erlenmeyer stérile contenant 5 ml de la solution de Céthéxonium à 5 %. Après mélange soigneux, l'erlenmeyer est placé à l'étuve à 37° pendant 30 minutes.

FILTRATION

Passé ce délai, on procède à la filtration du liquide dans l'appareil préalablement monté. (l'orifice du Büchner, coiffé d'une cape qui l'obture hermétiquement, ne laisse passer l'air que par un conduit muni d'un filtre de coton stérile.)

A défaut de cape, le couvercle d'une boîte de Pétri stérile peut convenir, à condition de travailler au voisinage d'un cône de chaleur.

La stérilisation du Büchner est effectuée au four Poupinel à 170° durant 1 h 30 ; celle du support fritté est réalisée, extemporanément, par flambage à l'alcool. La moitié du volume d'urine traité est alors versée sur la membrane que l'on soumet à un vide tout d'abord modéré, en veillant à maintenir en permanence la membrane immergée. Lorsque la totalité de l'urine a filtré, on procède au lavage de la membrane à l'aide de 40 ml d'eau distillée stérile, en maintenant une légère dépression. Parfois la filtration ou le lavage sont relativement difficiles et exigent un temps supérieur à 10 minutes.

Après filtration complète de l'eau de lavage, la membrane est prélevée, à l'aide de pinces stériles, et transférée rapidement dans une boîte stérile.

La zone périphérique qui assurait l'étanchéité du Büchner à la manière d'un joint n'ayant pas été en contact avec l'urine, est éliminée par découpage, en s'aidant de pinces et ciseaux flambés. La surface centrale est fractionnée dans des conditions aseptiques en trois secteurs approximativement égaux (10/12 mm de largeur) ainsi que le schématise la figure 2.



Figure 2 : Aspect de la membrane filtrante

- a) après filtration, la zone périphérique n'est pas colorée, seule la partie centrale a subi la filtration (en grisé sur la figure)
- b) la partie centrale a été découpée en trois secteurs.

MISE EN CULTURE

Les trois fragments de la membrane sont alors successivement prélevés, toujours à l'aide de pinces stériles, et introduits, sans attendre, dans un tube de milieu de culture.

Ces tubes auront reçu au préalable 5 à 8 gouttes de milieu liquide de Youmans. Décapuchonnés, ils auront été disposés à 37° en position verticale afin que le liquide de condensation qui imprègne le milieu à l'oeuf exude parfaitement.

La spatule de platine servira à déposer le fragment de membrane au fond du tube et à en racler la surface. Le produit de raclage est ensuite déposé à la surface du milieu à l'oeuf que l'on "rayera" en s'aidant de la spatule, ceci afin de créer des conditions de microaérophilie susceptibles de favoriser le développement de certains bacilles quiescents.

Les tubes recapuchonnés sont finalement placés inclinés à l'étuve à 37° et observés, toutes les semaines, pendant au moins 8 semaines.

III) - CONSIDERATIONS PRELIMINAIRES A L'ETUDE DES RESULTATS

1 - MILIEUX DE CULTURE

Connaissant les avantages attribués aux milieux gélosés au sang (du type de celui de Bordet-Gengou), par les auteurs anglo-saxons, nous avons utilisé pour nos premiers isollements celui proposé par M.S. TARSHIS. (65)

Nous nous sommes cependant rapidement rendu compte qu'il n'était guère adapté à la primoculture, tant il se polluait aisément.

En outre, malgré l'adjonction de glycérine, il se dessèche trop rapidement.

En conséquence, nous lui avons préféré les milieux classiques à l'oeuf*, modifiés selon A.M. JENSEN et P.J. COLETSOS, d'autant que la lécithine qu'ils contiennent neutralise efficacement l'effet néfaste dû au tensio-actif résiduel. (71)

Rappelons simplement pour mémoire qu'il s'agit de milieux solides, à base de jaune d'oeuf, renfermant, à côté de certains sels minéraux, de l'asparigine et du glycérol qui apportent respectivement l'azote et le carbone. Du vert malachite, en quantité variable selon le type de milieu, leur confère enfin une certaine résistance aux contaminants.

Le milieu liquide de G.P. YOUNG pour sa part répond à la formule suivante :

- sulfate bipotassique	0,5 g
- phosphate monopotassique	5 g
- asparigine	5 g
- glycérine pure	20 g
- eau distillée	1000 ml

Ajuster à pH 7, puis ajouter 1,5 g de citrate de magnésium. Après stérilisation à 120° pendant 20 minutes, ajouter stérilement 100 ml de sérum de boeuf, stérilisé par filtration.

2 - POUVOIR PATHOGENE EXPERIMENTAL

L'inoculation au cobaye ne fit qu'exceptionnellement partie de notre étude, les moyens matériels d'entretenir une importante animalerie, nécessitée par une expérimentation étendue, nous faisant défaut.

Nous y avons eu toutefois recours, dans un souci de confirmation, secondairement à l'isolement de bacilles acido-alcoolo-résistants, lorsque ceux-ci apparurent

* Nous avons utilisé pour cette étude les milieux commercialisés par l'Institut Pasteur de Paris.

en culture, émanant de sujets apparemment indemnes de toute tuberculose cliniquement reconnue.

3 - COLORATION DE ZIEHL

La coloration de ZIEHL modifiée (15), bien que réalisable directement sur membrane filtrante (5 - 69), ne fût pas retenue comme élément majeur de diagnostic. Les résultats de cet examen ne nous paraissent ni fidèles, ni sûrs.

En effet, sur 150 échantillons étudiés parallèlement, par filtration et centrifugation, 20 % seulement de ceux qui fournirent ultérieurement une culture, présentèrent des bacilles acido-alcoolo-résistants, alors que 4 %, en revanche, furent suspects au seul examen microscopique, la culture étant demeurée stérile.

A cet argument quantitatif, portant il est vrai sur un nombre restreint d'échantillons, nous ajouterons une objection d'ordre qualitatif, qui est l'existence de bacilles acido-alcoolo-résistants, banaux, non pathogènes, autrefois dénommés paratuberculeux, que l'on peut rencontrer dans l'urine de sujets indemnes de toute infection.

4 - MATÉRIEL D'ÉTUDE

Des 2863 échantillons d'urine soumis à l'analyse, selon le protocole décrit, il est possible de distinguer 2 groupes :

a) Un premier groupe de 2353 échantillons, provenant de sujets apparemment exempts de toute lésion tuberculeuse, mais présentant soit des troubles de la miction (pollakiurie par exemple), soit une hématurie ou une pyurie isolée, soit encore une image radiologique d'interprétation délicate.

b) Un second groupe de 515 échantillons, émanant de malades ayant présenté ou présentant une tuberculose de l'arbre urinaire. Ces 515 échantillons peuvent se subdiviser en :

- . 32 spécimens fournis par 22 sujets précédemment traités et apparemment guéris.
- . 100 spécimens obtenus chez 10 sujets pour lesquels 10 investigations successives furent pratiquées, principalement au début du traitement antibacillaire.
- . 376 spécimens provenant de sujets atteints d'une tuberculose rénale, non encore traitée, et pour lesquels le diagnostic avait été formulé sur la foi de renseignements cliniques, radiologiques, chirurgicaux, plus rarement

bactériologiques.

- 276 , parmi ces derniers spécimens, correspondent en fait à une seule investigation par malade, alors que 50 de ceux-ci bénéficièrent d'une triple recherche, c'est-à-dire portant sur 3 échantillons émis avec un intervalle de 3 à 5 jours.

DISCUSSION

5 - SENSIBILITE DE LA METHODE

Cet aspect quantitatif, à lui seul, peut déjà nous indiquer si le protocole proposé mérite créance. Dans un souci d'exactitude, et afin de disposer ultérieurement d'une base solide de comparaison, il nous a paru logique de disposer d'urines dans lesquelles la découverte de bacilles tuberculeux était des plus probable. Le groupe de 376 échantillons précédemment définis, forme à ce titre, un ensemble homogène et répond à ce souci.

CAS D'UNE RECHERCHE LIMITEE A UN SEUL ECHANTILLON PAR SUJET

Sur 276 mises en culture, 141 souches furent ainsi isolées d'emblée, ce qui traduit donc une "chance de découverte" de 51 % (51,09).

Cette sensibilité relativement modeste est retrouvée dans les résultats fournis récemment par des auteurs anglais (58), qui rapportent un taux plus faible, de l'ordre de 34 % (après centrifugation et traitement par la soude), à partir d'un groupe de sujets reconnus tuberculeux rénaux, mais non encore traités.

CAS D'UNE RECHERCHE PORTANT SUR 3 ECHANTILLONS PAR SUJET

Ici, les résultats apparaissent plus satisfaisants, puisque, pour les 50 sujets,

				% global de positivité
24	seulement	sont reconnus tuberculeux	dès la 1ère recherche	48
28	"	"	lors de la 2ème recherche	56
34	"	"	après la 3ème recherche	68

6 - RENDEMENT DU TRAITEMENT DECONTAMINANT

Toute tentative d'isolement d'une espèce microbienne donnée, à partir d'un produit pathologique, se heurte, presque toujours, à la même difficulté : neutraliser la flore adventice sans nuire à la vitalité de l'espèce considérée.

Ici, et bien que ces deux aspects soient intimement liés, le résultat du traitement décontaminant va condamner ou, au contraire, autoriser à lui seul la recherche, selon les modalités décrites.

Compte tenu des conditions particulièrement sévères de cette recherche :

- surinfection fréquente et massive : il n'est pas rare de compter 10^6 germes /ml.
- sensibilité indéniable du procédé à une pollution accidentelle, aérogène, (lors des manipulations qui suivent la filtration), le taux de contamination apparaît globalement faible, puisque, sur les quelques 2878 échantillons traités, 10 seulement présentèrent des cultures totalement ininterprétables pour les 3 milieux. 25, en revanche, fournirent des cultures discrètes de contaminants sur l'un ou l'autre des 3 milieux à l'oeuf.

En ce qui concerne ces contaminants, il est intéressant de noter :

- leur nature : Ils se répartissent également entre bactéries du genre *Bacillus*, levures, et plus rarement bacilles acido-alcool-résistants banaux,
- leur fréquence : *Bacillus* et fongi apparaissent principalement au début de l'automne et du printemps.

Mais, aucun des germes pathogènes les plus couramment rencontrés (dans la famille des entérobactéries) n'a été la cause de ces échecs.

La présence de bacilles acido-alcool-résistants n'est pas pour nous surprendre, car nous connaissons leur large ubiquité. Il s'agissait toujours, de bacilles scotochromogènes, appartenant au groupe II de RUYNON, non retrouvés lors d'une seconde recherche. Aucune signification pathologique ne semble devoir leur être attribuée. (55)

Plus singulière fut la découverte de bacilles authentiquement tuberculeux, tuberculinisant le cobaye, chez deux sujets apparemment indemnes de toute lésion tuberculeuse évolutive. Or, cette découverte resta unique tout au long d'une surveillance qui dura un an. Deux hypothèses nous semblent plausibles :

- 1°) Une primo-infection a bien eu lieu, qui a régressé spontanément.
- 2°) Le rein, qui filtre 180 litres de sang par 24 heures, est un émonctoire naturel par lequel tout germe peut transiter sans s'être fixé, bien que, l'ensemencement dans l'organisme puisse s'effectuer par dissémination hématogène.

Ces pollutions sont, dans une large mesure, indépendantes de l'expérimentateur et témoignent sans doute d'une toilette insuffisante lors du recueil

de l'échantillon. Quant aux deux périodes de l'année signalées, il s'agit d'un phénomène général que nous avons, pour notre part, déjà observé lors de contrôle de stérilité (73). Enfin, le milieu de Youmans, de conservation délicate, a pu être incriminé à trois reprises.

Ultérieurement, ce protocole mis entre les mains de plusieurs techniciens, fournit à cet égard des résultats tout à fait comparables.

En résumé, nous pensons que la filtration de l'urine traitée par le Céthéxonium, suivie de la mise en culture sur milieu à l'oeuf, se révèle un procédé suffisamment efficace pour être appliqué en pratique courante, le taux de contamination demeurant acceptable avec moins de 0,5 % de cultures ininterprétables. *

* Les travaux mettant en jeu la centrifugation et la soude font habituellement état d'un taux moins favorable, de l'ordre de 1 à 8 % de contaminants. (28 - 39 - 63)

CHAPITRE III

ETUDE CRITIQUE DE NOTRE METHODE

I) - IRREGULARITE DE LA BACILLURIE

Nous savons déjà que les chances de découvrir des bacilles tuberculeux croissent de façon significative avec l'augmentation du nombre d'investigations. Deux explications peuvent-être avancées qui expliquent ce fait. D'une part, le caractère capricieux et intermittent de leur élimination urinaire, lequel est à rapprocher d'un autre phénomène biologique caractérisant, en particulier, l'amibiase, avec des phases dites "obscurcs" pendant lesquelles le parasite ne peut être décelé.

D'autre part, les cultures sont le plus souvent pauvres et traduisent donc une bacillurie très faible. Aussi, même en tenant compte du caractère offensif du traitement par le Céthéxonium, qui ne laisse subsister que de 10 à 20 % des bacilles on ne compte par tube, le plus souvent, que quelques colonies, ce qui permet de chiffrer l'émission bactérienne à seulement quelques individus par ml.

Les résultats consignés dans le TABLEAU N° 6 résument une expérience centrée plus précisément sur l'irrégularité de la bacillurie, et qui a consisté à pratiquer dix recherches chez un sujet en attente de néphrectomie pour tuberculose rénale.

TABLEAU N° 6

IRREGULARITE DE LA BACILLURIE.

	<u>N O M B R E D E C O L O N I E S</u>		
	<u>JENSEN</u>	<u>COLETSOS B</u>	<u>COLETSOS BO</u>
24 Mai	-	-	-
26	-	10	10
27	-	-	1
2 Juin	-	-	-
7	-	2	-
8	3	10	3
9	-	1	-
27	-	-	-
28	-	4	Nombreuses
29	-	-	-

Ce tableau illustre l'hypothèse avancée précédemment, car 4 fois sur 10, la recherche demeura infructueuse et, à deux reprises, le diagnostic bactériologique devait uniquement reposer sur l'observation d'une seule colonie.

En outre, cette expérience évoque déjà les aléas de la culture, puisque si nous nous étions contentés du seul milieu de JENSEN, les chances de découverte auraient été bien faibles.

II) - MALADES SOUMIS A UN TRAITEMENT ANTIBACILLAIRE

Il est classiquement recommandé d'interrompre la médication pendant les 5 à 8 jours qui précèdent la recherche du bacille tuberculeux. (38)

L'expérience rapportée ci-après ne porte pas sur l'utilisation des antibacillaires majeurs les plus récents que sont Rifampicine et l'Ethambutol mais confirme la mesure énoncée en particulier par M. KENNEY.

Les malades traités recevaient systématiquement Streptomycine, I.N.H. et une perfusion de P.A.S.

Trois sujets (A - B - C), chez lesquels l'examen bactériologique avait été positif, furent ainsi suivis, pendant 15 jours, à raison d'une recherche tous les 3 jours, le matin, à 14 heures et 17 heures. Au total, 15 recherches furent entreprises par sujet.

Or, un fait singulier se produisit avec les échantillons de la journée : dès l'addition du Céthéxonium, un précipité important apparut qui ralentit ensuite la filtration, cependant que le dépôt brúnatre, arrêté par la membrane, se solubilisait ensuite, en grande partie, lors du lavage.

Nous n'avons pas manqué de rapprocher ce fait de l'administration du P.A.S. qui débutait, précisément, dans la matinée et pouvions craindre que l'incompatibilité chimique ainsi décelée souligne la précarité de l'examen bactériologique effectué dans ces conditions.

En outre, ne subsisterait-il pas du Céthéxonium résiduel sur la membrane, qui contrarierait la culture ?

Le Céthéxonium ainsi neutralisé, ne perdrait-il pas son pouvoir bactéricide ?

Nous avons pu vérifier que cette dernière crainte était vaine, car aucune contamination ne fût enregistrée.

En revanche, l'incidence du dépôt de Céthéxonium à la surface de la membrane a fait l'objet d'une étude quantitative particulière que nous exposerons.

Reste l'incidence de la thérapeutique proprement dite sur la recherche bactériologique, consignée dans le TABLEAU N° 7 où ne sont mentionnés que les résultats des cultures relatives au seul échantillon émis au réveil.

En effet, les deux autres recherches de la journée (14 h et 17 h) ne fournirent en aucun cas des cultures positives.

TABLEAU N° 7

RECHERCHE DU BACILLE TUBERCULEUX CHEZ DES SUJETS EN COURS DE TRAITEMENT

SUJETS	C U L T U R E S				
A	+	-	-	-	-
B	-	+	-	-	-
C	-	-	-	+	-
JOURS	3	6	9	12	15

Au total, si nous avons pu effectivement isoler, en cours de traitement spécifique, des bacilles tuberculeux, ce ne fût qu'avec un pourcentage très limité de réussite, à partir des seuls échantillons du matin, alors que le sujet n'avait plus reçu de médication depuis au moins 12 heures.

On peut concevoir que la structure des bacilles est plus ou moins modifiée par l'antibacillaire, leur vitalité en partie diminuée, ne sera valablement appréciée, par culture, qu'après avoir soustrait le germe de l'action du produit actif pendant un certain nombre de divisions cellulaires.

Considérant d'une part, le rythme très lent de multiplication des souches de collection (où les divisions ne se produisent guère que toutes les 18 à 20 heures) et d'autre part, les demi-vies variables des divers produits antibacillaires, il nous paraît souhaitable de ne rechercher les bacilles tuberculeux dans l'urine qu'après interruption du traitement pendant au moins 8 jours.

Dans le cas contraire, on s'expose, en plus, à pratiquer une malencontreuse détermination de pouvoir bactériostatique puisque tous les antibacillaires s'éliminent principalement selon un processus de filtration glomérulaire et se retrouvent

donc nécessairement dans les urines !

III) - COMPORTEMENT DES BACILLES TUBERCULEUX EXPOSÉS A L'ACTION DU CÉTHÉXONIUM

Un certain nombre de considérations nous ont finalement conduit à renoncer à une telle expérience faite directement sur des échantillons artificiellement contaminés par des bacilles tuberculeux :

- impossibilité de déterminer rigoureusement l'importance de l'inoculum (50), qui doit demeurer modeste pour refléter la réalité, imprécision dans l'interprétation de la culture puisque, dans ce cas particulier, une même colonie peut résulter tout aussi bien de la croissance d'un que de 10, voire 1000 individus.

- risque d'auto-contamination d'autant plus grand qu'un nombre important d'échantillons serait à manipuler.

- existence d'un effet "létal" (9) de l'urine pour le bacille tuberculeux ; ce facteur, variable d'une urine à l'autre, pouvant être une source d'imprécision dans l'interprétation des résultats.

- enfin et surtout la perspective de disposer d'une méthode permettant de chiffrer d'une manière autrement plus rigoureuse et comparative l'action du Céthéxonium sur des suspensions de bacilles tuberculeux.

IV) - VALEUR DE LA FILTRATION SUR MEMBRANE COMPAREE A CELLE DE LA CENTRIFUGATION

Ce dernier procédé, communément utilisé, consiste à traiter 50 ml d'urines à 3000 tours/minute, pendant 30 minutes, puis à exposer le culot à l'action d'une solution d'hydroxyde de sodium à 4 % (à volume égal), pendant 30 minutes à 37°, enfin à neutraliser par une solution d'acide sulfurique à 5 % en présence de teinture de tournesol. La totalité du liquide est alors déposée à la surface des 3 milieux à l'oeuf (JENSEN, COLETOS B, COLETOS BO).

100 échantillons appartenant au groupe homogène des 276 sujets tuberculeux furent ainsi comparativement traités :

- 51 cultures furent reconnues positives après filtration, tandis que 36 seulement, l'étaient après centrifugation.

- Aucun résultat positif ne le fut du seul fait de la centrifugation ; la filtration se révèle donc ~~fidèle et~~ plus sensible.

- Alors qu'aucune contamination ne fut observée après filtration, trois cultures se révélèrent polluées après centrifugation.

Le procédé proposé semble donc présenter, en première analyse, plus de mérite que celui qui est communément pratiqué.

V) - INTERET DE L'EMPLOI DE TROIS MILIEUX A L'OEUF DE COMPOSITIONS DIFFERENTES

L'expérience rendant compte de l'irrégularité de la bacillurie nous permet de préciser l'intérêt de l'emploi systématique de 3 milieux de culture différents.
(TABLEAU N° 6)

En effet, tant après la centrifugation que la filtration, il apparaît bien que le milieu dit de COLETOS B semble le mieux adapté à révéler la présence de bacilles tuberculeux d'origine uro-génitale.

Sur 10 recherches, le seul milieu de Jensen n'aurait permis de révéler la tuberculose qu'une seule fois, ceux de Coletos B, 5 fois et B0, 4 fois. En revanche l'emploi simultané des 3 milieux conduit à découvrir les bacilles tuberculeux dans 70 % des cas.

Ces bacilles présentent en commun la particularité de provenir de lésions sans communication directe avec l'oxygène atmosphérique.

Ce fait permet peut être d'expliquer que les colonies les plus précoces apparaissent presque toujours au niveau des anfractuosités créées dans le milieu lors de la mise en culture et raclage de la surface de ces milieux par la spatule de platine. Des conditions favorables de microaérophilie s'y trouvent réalisées.

Quoiqu'il en soit, les résultats rassemblés dans les TABLEAUX N° 6 et N° 8 permettent de préciser la nécessité qu'il y a à utiliser, systématiquement et parallèlement, trois milieux à l'oeuf différents.

TABLEAU N° 6

INTERET DE L'UTILISATION DE 3 MILIEUX A L'OEUF DIFFERENTS.

<u>N O M B R E D E C O L O N I E S</u>			
	<u>JENSEN</u>	<u>COLETSOS B</u>	<u>COLETSOS BO</u>
24 Mai	-	-	-
26	-	10	10
27	-	-	1
2 Juin	-	2	-
7	-	10	3
8	3	1	-
9	-	-	-
27	-	4	-
28	-	-	Nombreuses
29	-	-	-

TABLEAU N° 8

POURCENTAGES DE CULTURES POSITIVES

<u>PROCEDE</u>	<u>Résultats globaux</u>	<u>Résultats différentiels selon les milieux</u>		
		<u>JENSEN</u>	<u>COLETSOS B</u>	<u>COLETSOS BO</u>
FILTRATION	51	36	47	40
CENTRIFUGATION	36	25	31	27

VI) - FACTEURS SUSCEPTIBLES DE CONTRAINDRE LA PRATIQUE DE LA METHODE PROPOSEE

Dès notre étude préliminaire, nous avons craint l'incidence de nombreux paramètres :

En particulier, l'hématurie et la leucocyturie ne pourraient-elles gêner la filtration en colmatant les pores des membranes de 0,47 μ de diamètre ?

La présence de germes responsables d'un épisode infectieux aigu contemporain ne pourrait-elle masquer le développement des bacilles tuberculeux ?

La teneur parfois importante des urines en éléments minéraux ne pourrait-elle faire obstacle à la filtration en allongeant considérablement ce temps ?

Pour toutes ces raisons, et afin de rendre comparatifs les examens, il nous est apparu nécessaire de définir un protocole permettant de tenir compte de ces différents facteurs. (74)

Nous nous bornerons, ici, à rappeler le mode opératoire et les résultats de l'examen cytotubériologique des urines en pratique courante.

A - L'EXAMEN CYTOLOGIQUE

Celui-ci doit être entrepris dans les délais les plus brefs. Dans un but de standardisation, il nous a semblé intéressant d'appliquer systématiquement le compte d'Addis modifié par HAMBURGER, sans toutefois introduire la notion de débit.

Nous utilisons à cet effet des tubes transparents, en polystyrène, gradués précisément en demi-millilitres.

5 ml d'urine, convenablement homogénéisée, sont soumis à la centrifugation pendant 5 minutes, à 2000 tours/minute ; à l'issue de ce temps, on prélève 4,5 ml afin de procéder éventuellement aux recherches chimiques (glucose, protéines,...), puis le culot est remis soigneusement en suspension dans le volume résiduel.

On réalise ainsi une concentration 10 fois plus grande des éléments figurés. Cette suspension est alors disposée dans une cellule hématimétrique de MALASSEZ. L'examen microscopique, après sédimentation, permet de dénombrer la moyenne des leucocytes et hématies observés pour 10 rectangles. Ce nombre, multiplié par 1000, fournit la teneur par ml en leucocytes et hématies.

On signalera l'importance des cellules épithéliales témoins de la desquamation de l'arbre urinaire, ainsi que la présence éventuelle et la nature des cylindres, bien que leur signification soit actuellement controversée.

On identifiera enfin les cristaux dont on pourra préciser la taille.

B - L'EXAMEN BACTERIOLOGIQUE

Il comporte classiquement deux temps : l'examen microscopique direct puis la culture.

1°) L'examen microscopique

Il se pratique à l'objectif à immersion, et porte sur une microgoutte d'urine concentrée 10 fois qui est simplement déposée, au moyen de l'anse de platine, sur une lame porte-objets (parfaitement dégraissée) puis, évaporée, fixée et colorée selon la méthode de GRAM.

2°) L'uroculture appliquée aux germes banaux

De l'urine non centrifugée, convenablement homogénéisée, est prélevée aseptiquement au moyen d'une anse de platine irridié, calibrée *.

L'anse est alors appliquée sur la surface d'un tube de gélose inclinée (gélose trypticase-soja ou gélose T).

Cependant, en vue d'obtenir un meilleur isolement des germes éventuellement présents, il nous est apparu préférable de pratiquer le dépôt à mi-hauteur de la pente, puis de couvrir toute la surface de la gélose en montant et descendant plusieurs fois tout en opérant des stries serrées, sans affleurer l'eau de condensation.

L'application stricte de ce protocole permet d'obtenir, en haut de pente, des colonies isolées. Toutefois, lorsqu'une polyinfection est suspectée, onensemencera parallèlement des milieux sélectifs (CHAPMAN, E.B.M.,...).

Le milieu est disposé à l'étuve durant 24 heures à 37°.

L'identification des germes apparus en culture est ensuite conduite selon les procédés habituels.

RENSEIGNEMENTS A ATTENDRE DE CET EXAMEN CYTOBACTERIOLOGIQUE

α) - ETUDE CYTOLOGIQUE

Le sédiment urinaire est normalement pauvre en éléments. 5000 éléments /ml, nous paraît être la teneur extrême en hématies ou en leucocytes.

Un chiffre supérieur à 10.000 éléments /ml, témoigne d'une lésion dont le siège et l'étiologie seront à préciser.

* Longueur du fil : 60 mm
Diamètre du fil : 7/10
Diamètre intérieur de la boucle soudée : 3 mm.

Pour des raisons évidentes de cytolyse, l'examen cytologique doit être accompli très rapidement, en pratique dans les deux heures qui suivent l'émission. La conservation par le froid à $+ 4^{\circ}$, ne doit être considérée que comme un pis aller car elle suscite très souvent la précipitation massive d'urates difficiles à redissoudre. Par ailleurs, la survie des leucocytes est imprévisible et leur identification devient aléatoire pour peu que des levures pullulent. (75)

On peut s'aider, dans les cas d'observation défavorable, d'une coloration au diaminofluorène, faisant intervenir l'activité peroxydasique des leucocytes. (56)

Nos normes s'accordent bien avec les données les plus récentes de la littérature qui fixent, par exemple en pédiatrie, à 4000 éléments /ml la limite supérieure des éléments figurés. (66)

La reproductibilité de ce protocole varie évidemment avec la concentration des éléments. Elle devient toutefois acceptable dès que l'hématurie ou la leucocyturie atteint la zone critique précitée. Pour notre part, l'erreur constatée est alors voisine de 10 % mais répond amplement aux exigences cliniques.

Pour 88 % des urines recélant une bactériurie indiscutable (supérieure à 10^5 germes /ml), nous avons noté un nombre de leucocytes ou hématies supérieur à 10.000 /ml.

Au contraire, dans 5 % des cas, le nombre de ces éléments demeura inférieur à 5000 /ml durant tout le cours de l'épisode infectieux.

La dissociation inverse, cytologie anormale alors que l'uroculture demeure constamment stérile, s'observe également.

(Les résultats de la numération des éléments rapportés au débit urinaire ont néanmoins toujours confirmé ceux exprimés par ml).

INCIDENCE DU NOMBRE D'ÉLÉMENTS FIGURÉS SUR LE TEMPS DE FILTRATION

Le temps de filtration apparaît relativement indépendant du nombre des éléments figurés, jusqu'à 10^5 /ml.

Il est, quelle que soit la tranche considérée, entre 30.000 et 100.000 éléments, en moyenne de 4 minutes 30. Toutefois, la gêne résultant d'une hématurie massive peut être levée au moyen d'une solution hémolysante de saponine (20 μ l d'une solution à 2 % pour 50 ml d'urine).

En revanche, un sédiment minéral (urates, phosphates) ou un précipité dû à l'addition de Céthéxonium entraîne une augmentation très nette du temps de filtration.

En pratique courante, nous renonçons à poursuivre la filtration lorsque ce temps excède 30 minutes. Soit, que nous reportions ultérieurement la filtration,

soit qu'en cas d'échecs réitérés, nous procédions à la centrifugation.

En outre, nous avons constaté que le temps de filtration était inversement proportionnel à la température du liquide à filtrer. (TABLEAU N° 9)
Ainsi, pour une urine pauvre en sédiment minéral mais présentant 50.000 leucocytes /ml et 10.000 hématies /ml, les valeurs obtenues sont consignés dans le TABLEAU N° 9.

TABLEAU N° 9

TEMPS DE FILTRATION EN FONCTION DE LA TEMPÉRATURE DU LIQUIDE.

TEMPÉRATURE	TEMPS DE FILTRATION
22°	5 minutes 30
28°	4 minutes 30
32°	3 minutes 30
37°	3 minutes
40°	3 minutes
45°	2 minutes

Aussi, afin de ne pas nuire à la vitalité des bacilles tuberculeux, nous avons, dans notre protocole, choisi la température usuelle de 37°.

En revanche, la naissance d'un précipité, parfois abondant et gênant, après addition de Céthéxonium n'a pas manqué de nous intriguer. Cette précipitation ne dépend, ni du nombre de leucocytes ou d'hématies, ni de la teneur en ions usuels ou en albumine.

Nous pensons que cette précipitation révèle simplement la réaction qui a opposé un anion (médicament ou produit du métabolisme) avec le cation qu'est le Céthéxonium. Le composé en résultant étant, dans la majorité des cas, insoluble dans l'eau.

Cette incompatibilité n'est-elle d'ailleurs pas mise à profit dans le test de J. MARTIN (47) connu également sous le nom de test au cétavlon qui évalue la teneur en mucopolysaccharides acides du sérum et décèle certains états inflammatoires.

Dans le même ordre d'idées, K. MURATA (52) a pu proposer un dosage de l'héparine in vitro.

Nous nous sommes donc attachés à relever dans la littérature les travaux consacrés à l'élimination urinaire des mucopolysaccharrides acides, élimination considérablement accrue dans quelques anomalies métaboliques, telles certaines oligophrénies et surtout le GARGOYLISME ou maladie de Hurler. (16 - 68)

Nous pensons donc que ce phénomène ne répond pas à une explication univoque et qu'il serait intéressant d'en préciser les conditions d'apparition.

Il a néanmoins eu le mérite d'attirer notre attention sur la rémanence probable et peut-être néfaste du Céthéxonium à la surface de la membrane.

CORRELATION ENTRE BACILLURIE ET NOMBRE D'ÉLÉMENTS FIGURÉS

Nous n'avons rencontré que 8 échantillons sur 376 qui offraient moins de 10.000 hématies ou leucocytes par ml, alors qu'il s'agissait de sujets authentiquement tuberculeux.

Pour 24 autres échantillons, ce nombre était compris entre 10.000 et 20.000 par millilitre.

En conséquence, bien que dans 90 % des cas, la cytologie soit franchement anormale, inversement on ne devrait négliger la recherche du bacille tuberculeux lorsque le nombre d'hématies ou leucocytes éliminés apparaît sensiblement normal.

) L'URCCULTURE

L'urine est normalement stérile. En pratique courant, compte tenu du mode de récolte, nous considérons comme accidentelle la présence de moins de 5.000 germes /ml ; l'anse de platine délivrant environ 5µl, une telle éventualité se traduit donc par quelques 25 colonies microbiennes.

Utilisant la technique bactériologique classique des dilutions, les premiers auteurs (36 - 37) montrèrent que l'on pouvait schématiquement distinguer trois zones :

- | | | |
|--------------------------------------|---|------------------------|
| - moins de 10.000 germes /ml | = | contamination certaine |
| - entre 10.000 et 100.000 germes /ml | = | résultat à confirmer |
| - au-dessus de 100.000 germes /ml | = | infection certaine. |

Il nous semble cependant que ces normes ne peuvent être strictement appliquées que lorsque le volume d'urine recueilli est suffisant, c'est-à-dire supérieur à 50 ml. On conçoit en effet aisément qu'une pollution microbienne accidentelle, bien que minime en soi, apparaisse considérable si le volume dans

lequel elle se trouve est petit. (De l'ordre de quelques millilitres)

Transposés à notre protocole, les résultats attendus seront donc :

- moins de 25 colonies = contamination certaine
- de 25 à 50 colonies = contamination d'autant plus probable que plusieurs espèces microbiennes se côtoient ; un second examen lèvera le doute.
- culture massive = infection hautement probable.

La facilité de mise en oeuvre de ce protocole nous permet de suivre systématiquement l'éventuelle bactériurie * associée, d'en connaître à la fois la nature et l'importance.

Parmi les 376 échantillons, émis par des tuberculeux rénaux, 48 présentaient, en outre, une infection où les bactéries à gram - prédominaient :

- Escherichia coli chez 34 sujets
- Enterobacter chez 3 sujets
- Pseudomonas aeruginosa chez 1 sujet
- Citrobacter chez 1 sujet
- Faecalis alcaligenes chez 1 sujet
- Streptococcus faecalis chez 6 sujets
- Staphylococcus aureus chez 2 sujets

Plus intéressante est la constatation, précédemment signalée, qu'aucune contamination des milieux à l'oeuf ne fut le fait de ces germes responsables d'un épisode infectieux aigu surajouté alors qu'ils étaient présents couramment à plus de 10^5 unités par ml.

Devant cette parfaite activité décontaminante du Céthéxonium, quelle que soit la richesse ou la nature des germes usuels présents, il importait également de connaître le comportement du bacille tuberculeux.

Nous n'avons pas été sans reconnaître que l'addition du Céthéxonium se traduisait parfois par l'apparition d'un précipité et nous avons ainsi pu craindre qu'il ne subsiste, à la surface de la membrane, une certaine quantité de surfactif qui viendrait contrarier le développement ultérieur du bacille tuberculeux.

Il nous fallait donc, d'une part, doser le Céthéxonium résiduel et, d'autre part, disposer d'un protocole d'étude aussi quantitatif que possible nous permettant d'apprécier son activité tuberculostatique.

* Par commodité nous convenons de distinguer la bacillurie qui s'applique à l'existence de bacilles tuberculeux dans l'urine et la bactériurie qui exprime la présence de bactéries d'autre espèce.

VII) - TENEUR DE L'INOCULUM EN CETHEXONIUM RESIDUEL

1 - EVALUATION MICROBIOLOGIQUE

a) PRINCIPE

Des dilutions croissantes de l'ammonium quaternaire, en bouillon peptoné, sont ensemencées et portées à l'étuve à 37° ; après incubation, on note la dilution extrême inhibant la culture microbienne.

b) PROTOCOLE

Gamme étalon de Céthéxonium

A partir d'une solution mère, stérile, à 0,025 %, on prépare, en bouillon nutritif ordinaire, une série de dilutions de façon à obtenir finalement des concentrations en Céthéxonium égales à 1 pour 250.000 - 300.000 - 350.000 - 400.000 - 500.000.

Ces différentes dilutions sont ensuite ensemencées avec deux gouttes d'une culture de 24 heures, de *Staphylococcus aureus*, et la lecture s'effectue après 4 jours d'incubation à l'étuve à 37°.

Le taux de dilution du Céthéxonium contenu dans le dernier tube ne présentant aucune culture correspond à la Concentration Minimale Inhibitrice (C.M.I.), que nous avons retrouvée régulièrement égale à 1/400.000 au cours des différents essais successifs.

c) DOSAGE DU CETHEXONIUM RETENU PAR LA MEMBRANE

Le dépôt membranaire, gratté au moyen d'une spatule, ainsi que la membrane sur laquelle a eu lieu la filtration sont placés dans un petit ballon, bouché émeri, contenant une dizaine de billes de verre et 5 ml de bouillon nutritif stérile.

Après 15 minutes à 37° et agitation vigoureuse, cette solution mère ainsi obtenue est diluée en bouillon nutritif par exemple au 1/2 - 1/4 - 1/6 - 1/8 - 1/10.

Ces différentes dilutions y compris la solution mère sont ensuite ensemencées et placées à l'étuve à 37° comme précédemment.

Il suffit ensuite de rechercher quelle est la dilution susceptible de provoquer l'inhibition de la culture.

Connaissant la C.M.I., on en déduit la concentration en Céthéxonium au niveau de la membrane.

En supposant une C.M.I. égale à 2,5 mcg/ml et une inhibition observée avec la dilution au 1/2 de la solution mère, on en déduira, compte tenu du volume

initial de bouillon (5 ml) qui est celui de la solution mère que la teneur en Céthéxonium au niveau de la membrane est égale à $2,5 \times 2 \times 5 = 25$ mcg.

2 - EVALUATION CHIMIQUE

Désireux de poursuivre cette détermination sur un grand nombre d'échantillons, nous avons opté pour un protocole permettant d'obtenir des résultats plus rapides.

A cet effet, nous nous sommes inspirés, en la rendant quantitative, d'une technique décrite par R. CHARONNAT (8) et qui présente l'intérêt d'être également extrêmement sensible puisque permettant de détecter un ammonium quaternaire en solution à la concentration de quelques parties par million (p.p.m.) seulement.

a) PRINCIPE

Les ammoniums quaternaires donnent, en milieu alcalin, avec certains colorants anioniques, des combinaisons extractibles par les solvants organiques dont la coloration témoigne de la présence du surfactif.

b) PROTCCOLE

Gamme étalon

A partir d'une solution mère étalon de Céthéxonium, à 5 %, on réalise, par dilution, les solutions de travail suivantes :

a -	2,5	mcg/ml	soit une dilution finale de	1/400.000
b -	5	mcg/ml	"	" de 1/200.000
c -	7,25	mcg/ml	"	" de 1/160.000
d -	10	mcg/ml	"	" de 1/100.000
e -	15	mcg/ml	"	" de 1/66.666

Céthéxonium retenu par la membrane

Les membranes qui ont subi la filtration d'urines sont traitées comme précédemment, mais ici le volume d'eau distillée servant à l'extraction est de 50 ml.

Cet extractum fournit, par dilution au 1/4, la solution de travail. (Il conviendra, toutefois, lorsque le chiffre lu au spectrophotomètre dépassera 1 densité optique, de recommencer après une dilution plus grande, par exemple au 1/8).

c) REACTIFS

- Solution aqueuse d'hélianthine à 0,15 %
- Lessive de soude (densité 1,33) diluée au demi
- Chloroforme R.P.
- Sulfate de sodium anhydre
- Acide chlorhydrique, environ 2 N

d) EXTRACTION

A 50 ml de dilution, placés dans une ampoule à décanter de 250 ml, sont ajoutés :

- 0,5 ml de la solution d'hélianthine
- 1 ml de la solution de soude

Le complexe coloré est extrait, en trois fois, par 50 ml de chloroforme.

La solution chloroformique est alors séchée sur sulfate de sodium anhydre (environ 7 g), puis filtrée.

Cette coloration apparaît cependant faible, mais on peut en accroître l'intensité en ré-extrayant l'hélianthine, sous forme acide, après dissociation de la combinaison ammonium-hélianthine. La sensibilité de la méthode s'en trouve ainsi améliorée.

On traitera, à cet effet, 2,5 ml de la solution chloroformique par 5 ml de la solution chlorhydrique.

La dissociation est instantanée et la séparation de la solution aqueuse, aisée.

e) LECTURE

La lecture a lieu, en cuve de 10 mm de traversée, au spectrophotomètre, à 505 nm, le 100 % de transmission s'effectuant à l'aide d'une solution chlorhydrique qui a été mise au contact de chloroforme.

Une courbe d'étalonnage, obtenue en traitant parallèlement les solutions de la gamme étalon, nous montre que la coloration ainsi révélée suit bien la loi de BEER - LAMBERT et que l'extraction est fidèle. (Figure 3 - TABLEAU N° 10)

TABLEAU N° 10

GAMME D'ETALONNAGE.

Solutions	Concentration en mcg/ml de Céthéxonium	Densités optiques relevées
a	2,5	0,16
b	5	0,32
c	7,25	0,45
d	10	0,59
e	15	0,85

Compte tenu des dilutions successives, la concentration résiduelle en Céthéxonium est traduite en mcg/ml, en supposant toujours que la membrane a bien été éluée par seulement 1 ml d'eau distillée. (Cette hypothèse nous paraît plausible et comparative si l'on veut bien se rappeler que dans notre protocole de traitement des urines, nous fournissons à chaque tube qui recevra 1/3 de la membrane, environ 0,3 ml de milieu de Youmans).

Une comparaison limitée des deux procédés (microbiologique et chimique), montra une bonne corrélation, tout au moins pour les plus fortes concentrations, ce qui nous encouragea à étudier le comportement d'un plus grand nombre d'échantillons, et à déterminer chimiquement la teneur résiduelle en ammonium.

Au total, 78 filtrations ont été pratiquées dans ce but.

Le TABLEAU N° 11 ci-joint illustre une partie des résultats se rapportant aux précipités les plus importants.

Densité Optique

0,75

0,50

0,25

0

2,5

5

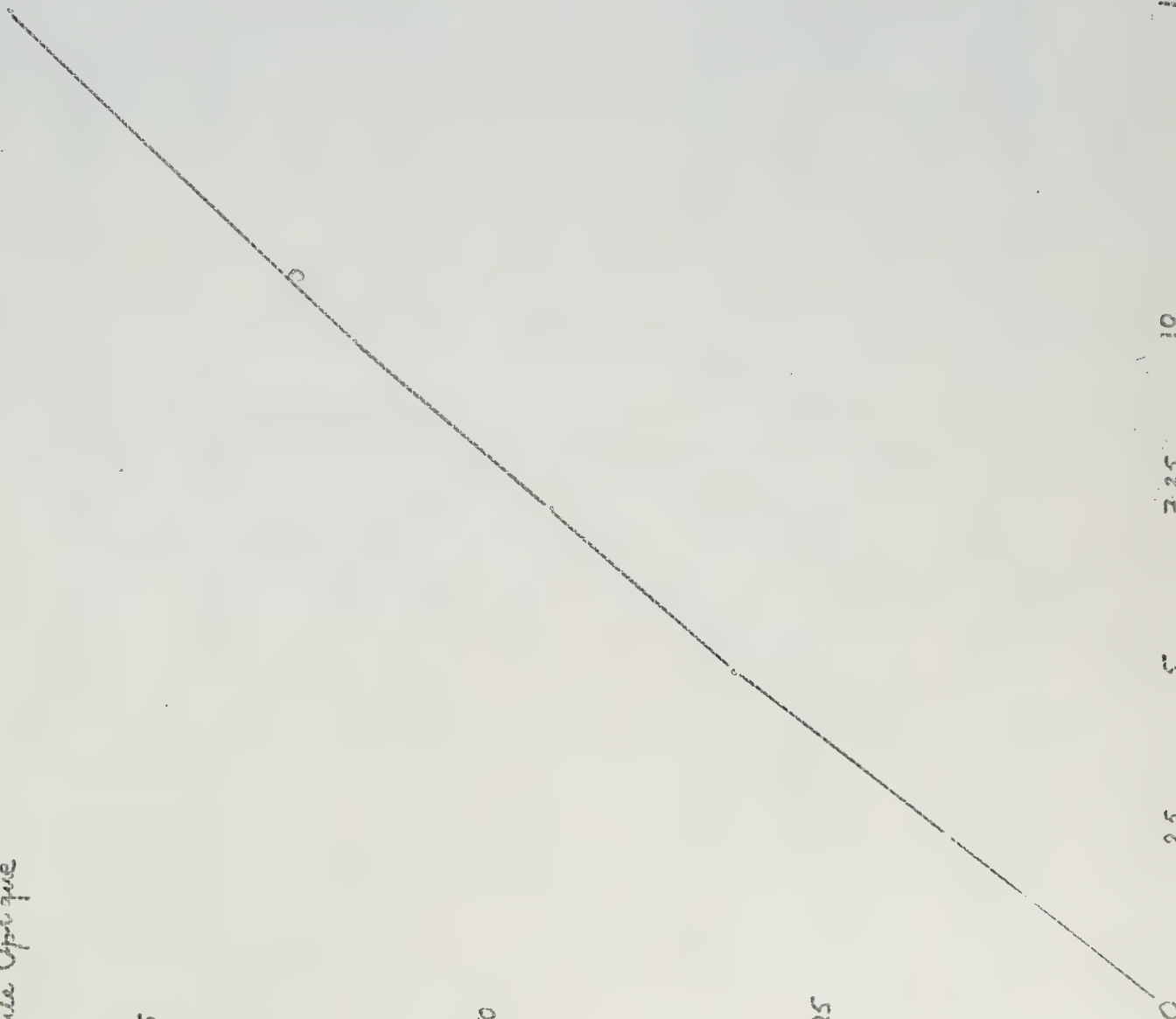
7,25

10

15

Figure 3 : Courbe d'étalonnage

Concentration de
CETHEXONIUM en mcg/ml



TENEUR DE LA MEMBRANE EN CETHEXONTIUM

Echantillons	Caractéristique			Temps de filtration en minutes	Précipité		Concentration exprimée en mcg/ml de Céthexoni
	Hématies par ml	Leucocytes par ml	pH		Apparition Aspect Importance	Poids (sec en mg)	
A	10.000	sup. à 1.000.000	6	15	Laiteux à froid	150	0,58
B	500	40.000	5,5	5	Abondant à froid	140	0,58
C	1.000.000	10.000	7	5	Faible à chaud	25	0,58
D	2.000	30.000	6	4	Abondant à froid	14	1,04
E	16.000	120.000	5,8	4	Faible à froid	21	0,64
F	500	6.000	6,8	4	Faible à chaud	22	1,04 .
G	30.000	800.000	5,5	10	Faible à froid	29	3,10
H	3.000	25.000	5,4	2	Abondant à froid	22	1,24
I	10.000	15.000	7	2	Faible à froid	22	0,58
J	4.000	8.000	5,2	3	Abondant à froid	15	1,00 .
K	500	10.000	8	3	Abondant à froid	100	1,68

TENEUR DE LA MEMBRANE EN CETHEXONIUM

Echantillons	Caractéristique			Temps de filtration en minutes	Précipité		Concentration exprimée en mcg/ml de Céthéxonium
	Hématies par ml	Leucocytes par ml	pH		Apparition Aspect Importance	Poids (sec en mg)	
A	10.000	sup. à 1.000.000	6	15	Laiteux à froid	150	0,58
B	500	40.000	5,5	5	Abondant à froid	140	0,58
C	1.000.000	10.000	7	5	Faible à chaud	25	0,58
D	2.000	30.000	6	4	Abondant à froid	14	1,04
E	10.000	120.000	5,8	4	Faible à froid	21	0,64
F	500	6.000	6,8	4	Faible à chaud	22	1,04
G	30.000	800.000	5,5	10	Faible à froid	29	3,10
H	3.000	25.000	5,4	2	Abondant à froid	22	1,24
I	10.000	15.000	7	2	Faible à froid	22	0,58
J	4.000	8.000	5,2	3	Abondant à froid	15	1,00
K	500	10.000	8	3	Abondant à froid	100	1,68

Les échantillons A et B correspondaient à des urines de tuberculeux rénaux.
E-G-H-I-J-K contenaient un germe banal (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*,
Citrobacter, ...)
Seuls les échantillons C et D étaient amicrobiens.

Nous constatons donc qu'il n'existe aucune relation simple entre la teneur du précipité en Céthéxonium et le temps de filtration, ni même avec la concentration en éléments figurés.

Tout au plus peut-on craindre qu'à partir d'un certain seuil, une leucocyturie massive allonge le temps de filtration.

Les échantillons A et G renfermant respectivement plus de 1.000.000 et 800.000 leucocytes par ml confirment cette crainte.

En revanche la teneur, après filtration, en ammonium ne dépend pas du nombre d'éléments figurés présents dans l'échantillon à filtrer.

Alors que le spécimen A qui renfermait plus de 1.000.000 de leucocytes par ml n'a laissé que 0,58 mcg/ml de Céthéxonium sur la membrane, on en décelait 1,68 mcg/ml avec l'échantillon K qui contenait 100 fois moins d'éléments.

CHAPITRE IV

COMPORTEMENT DES BACILLES TUBERCULEUX SOUMIS A L'ACTION DU CETHÉXONIUM

L'importance du Céthéxonium résiduel étant ainsi déterminée, restait à en préciser l'effet sur la croissance du bacille tuberculeux. Les méthodes usuelles ne nous parurent pas devoir répondre précisément à cet objectif, principalement pour les deux raisons suivantes :

- 1°) Les milieux solides à l'oeuf, par la lécithine qu'ils renferment, neutralisent partiellement le surfactif. (71)
- 2°) La numération des colonies de Mycobactéries est imprécise.

En effet, pour demeurer significative et comparative, notre étude aurait dû porter sur des suspensions mycobactériennes suffisamment diluées, allant jusqu'à 10 ⁻⁶ mg/ml. (Concentration voisine de celle rencontrée dans les urines).

Or nous n'étions pas sans savoir que le nombre de colonies qui apparaissent sur milieu à l'oeuf, après ensemencement de suspensions de plus en plus diluées, peut décroître beaucoup moins que prévu. (2)

L'explication réside principalement dans la qualité de la suspension initiale, qui, si l'on se réfère aux techniques recommandées, est loin d'être parfaite, riche en amas contenant des milliers de germes. Ces amas sont fragiles, se fragmentent irrégulièrement en cours de pipetage, d'autant mieux que le pipetage est soigneux !

Or, ces amas de 100, voire 10.000 bacilles fournissent, sur milieu solide, une seule colonie tout comme le ferait un seul bacille.

En conséquence, nous avons envisagé d'appliquer un procédé qui intègre l'ensemble des facteurs et envisage le phénomène globalement.

L'étude de la respiration cellulaire nous parut au contraire répondre à ce souci, aussi nous sommes nous intéressés aux possibilités que pouvait nous offrir l'appareil de WARBOURG pour évaluer les variations de la consommation en oxygène et par voie de conséquence, l'effet tuberculostatique du surfactif.

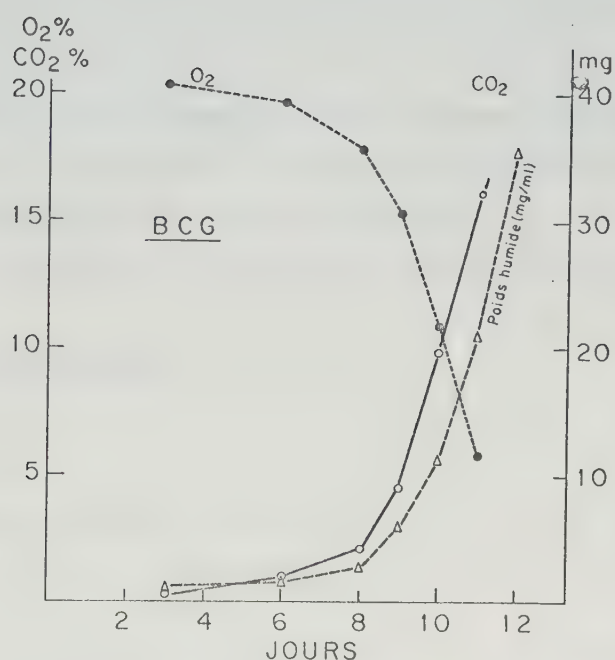
Dans le domaine des Mycobactéries, ce procédé avait en outre permis, antérieurement, à J. BRETEY (41), de suivre la culture en cuve du bacille de CALMETTE ET GUERIN.

Nous avons eu la fortune de bénéficier des précieux conseils de J. BRETEY, qui nous confia avoir observé que les courbes d'oxygène consommé ou d'hydrogène carbonique produit étaient en bon accord avec celles du poids microbien élaboré,

(du moins, pendant la phase arithmétique du développement ; Courbe ci-après.)

Cependant, la plus grande rapidité, la meilleure reproductibilité des dosages, le moindre volume des échantillons gazeux requis, la très faible incidence des contamination, incitaient à préférer la mesure par un procédé original de l'anhydride carbonique produit.

L'appareil de WARBOURG se révélant en effet inapproprié à de nombreux dosages, en série, J. BRETEY nous offrit, avec bienveillance, de bénéficier de ses recherches actuelles portant sur un nouveau mode de mesure de la résistance des Mycobactéries aux antibiotiques.



COURBE DE CROISSANCE D'UNE SUSPENSION DE B.C.G.

I) - MESURE DE L'ANHYDRIDE CARBONIQUE PRODUIT PAR DES MYCOBACTERIES EN COURS DE CULTURE

a) PRINCIPE

La culture s'effectue en milieu liquide, dans des flacons hermétiquement clos. Avant que le voile mycobactérien n'apparaisse, l'anhydride carbonique produit au cours de la culture est injecté dans la chambre à gaz d'un spectrophotomètre infra-rouge dont le détecteur est réglé pour la mesure spécifique de ce gaz.

Les mesures étant comparatives, les valeurs absolues ne présentent qu'un intérêt limité. D'autre part, en disposant d'un analyseur à réponse linéaire pour les concentrations de l'ordre de 0 à 4 %, le résultat de la lecture s'exprime en millivolts (mV), et n'a pas besoin d'être converti en pourcentage d'anhydride carbonique.

Ainsi, de même qu'en spectrophotométrie on compare entre elles des densités optiques, ici, nous aurons à comparer des millivolts (mV).

Ce procédé est par ailleurs couramment appliqué à l'analyse toxicologique des atmosphères.

En procédant parallèlement à des cultures en présence ou en absence de surfactif, nous disposons donc d'un moyen rapide d'évaluer l'influence du Céthéxonium sur la croissance mycobactérienne.

Comparée au témoin, la culture s'exprime selon un pourcentage de survivants.

b) MODE OPERATOIRE

Milieu de culture

Des milieux liquides usuels, nous avons retenu celui de YOUNG qui est tenu pour être celui qui offre le plus de ressemblance avec les liquides biologiques.

Filtré aseptiquement sur membrane, il est utilisé dans les heures qui suivent sa préparation. (Formule page 20)

On veillera, en particulier, à ne pas souffler d'air lors des pipetages ; de même, on travaillera suffisamment loin du cône de chaleur pour ne pas introduire, artificiellement, d'anhydride carbonique. (Malgré cette dernière condition défavorable, nous n'avons compté qu'une seule contamination).

Enfin, nous avons utilisé pour la préparation des suspensions mycobactériennes un agitateur vibrant, de type VORTEX.

Suspensions mycobactériennes

Après 10 à 15 jours de culture sur milieu de JENSEN, les souches retenues

sont prélevées au moyen d'une spatule et portées en eau distillée stérile de manière à réaliser une suspension à 1 mg/ml. Cette première suspension est effectuée dans un ballon stérile de 250 ml, contenant quelques gouttes d'eau distillée et une vingtaine de billes de verre (diamètre 5 mm).

Par comparaison opacimétrique avec une gamme de suspensions de bacilles étalonnées en poids, on détermine la dilution nécessaire pour ajuster à la concentration souhaitée.

Gamme Témoin

Une gamme de suspensions, dépourvues de tout tuberculostatique, est préparée afin de servir de référence.

Le témoin 100 % (T 100) est simplement préparé par dilution au dixième de la suspension mère dans du milieu de YOUMANS.

A partir de ce témoin 100 %, on prépare, par dilution successive au dixième, un témoin 10 % (T 10) et un témoin 1 % (T 1).

(Une pipette différente sert pour effectuer chaque dilution).

Gamme additionnée de Céthéxonium

Connaissant les taux résiduels de Céthéxonium après filtration, nous avons envisagé d'analyser le comportement des suspensions vis-à-vis de concentrations respectivement égale à 80, 40, 20 et 10 mcg/ml de ce produit.

A cet effet, 0,1 ml d'une solution stérile de Céthéxonium à 50.000 mcg/ml introduit dans 60 ml de milieu de YOUMANS permet d'obtenir une concentration sensiblement égale à 80 mcg/ml.

Par dilutions successives au demi, en milieu de YOUMANS, on réalise la gamme envisagée.

Chaque tube de la gamme estensemencé ensuite avec le même volume de suspension mycobactérienne, volume correspondant au témoin 100 % de la gamme étalon.

Répartition et incubation

Ces suspensions sont distribuées, sous un volume de 1,5 ml, au moyen de pipettes stériles de 5 ml, au 1/20, dans des flacons vides, stériles de type Pénicilline, de 15 ml.

La fermeture en est réalisée normalement, par bouchon de caoutchouc serti. On aura pris la précaution, au préalable, de débarrasser superficiellement ces bouchons de toute trace de vernis, par séjour pendant 24 heures à température ordinaire, dans l'alcool à 90°.

Afin de minimiser les conséquences d'une éventuelle pollution, nous avons pris l'habitude d'effectuer primitivement nos essais à raison de cinq exemplaires par dilution. En fait, à l'usage, cette crainte se révélant vaine, nous n'avons

conservé que trois échantillons identiques, afin de réduire la marge d'erreurs résultant d'une distribution inégale.

L'incubation a lieu dans une étuve à 37° pourvue d'un ventilateur qui y assure un brassage énergique d'air et maintient, en tous endroits une température régulière à 2 ou 3 dixièmes de degrés près.

On procède au dosage avant que les cultures, dans les témoins 100 %, ne fournissent un voile car elles ne seraient, dès lors, plus comparatives.

Dans la pratique, il suffit que le développement soit suffisant dans le témoin 1 %, ce qui se traduit macroscopiquement par la présence de quelques amas de germes.

Ce fait intervient après 5 à 10 jours d'incubation. Seule la richesse de l'inoculum et la vitalité de la souche conditionnent ce délai de croissance.

c) DOSAGE

L'atmosphère du flacon hermétiquement clos est déplacée par une solution saturée de chlorure de sodium en s'aidant d'un injecteur à trois voies. Un tube capillaire conduit le gaz dans la chambre détectrice du spectrophotomètre.

Sachant que la quantité d'anhydride carbonique produite par le témoin 100 % avant que le voile n'apparaisse, est de l'ordre de 3 à 4 %, on pourra, à titre indicatif, régler la réponse de l'enregistreur de telle sorte que, pour une sensibilité moyenne, la déviation totale de l'aiguille soit obtenue en injectant un mélange gazeux étalon contenant 2 % d'anhydride carbonique.

d) RESULTATS

Les résultats s'inscrivent en millivolts (mV).

Pour plus de commodité, ceux de la gamme témoin sont reportés sur un papier à coordonnées semi logarithmiques, ce qui permet, par simple comparaison avec la courbe tracée, de connaître, pour chaque dilution de Céthéxonium, le pourcentage de survivants. (En prenant soin de calculer la moyenne arithmétique des résultats des mesures correspondant à chacun des 3 échantillons).

e) REPRODUCTIBILITE

Afin de déterminer la dispersion, nous avons soumis 21 fois à l'analyse la même suspension microbienne, par exemple un témoin à 100 % (T 100).

(TABLEAU N° 12)

TABLEAU N° 12

VALEURS FOURNIES PAR LA CROISSANCE DE 21 SUSPENSIONS BACTERIENNES IDENTIQUES.

mV	CO ₂ en g %	d	d ²
0,606	2,99	0,02	0,0004
0,580	2,83	0,14	0,0196
0,555	2,67	0,30	0,0900
0,640	3,20	0,23	0,0529
0,645	3,23	0,26	0,0676
0,580	2,83	0,14	0,0196
0,635	3,16	0,19	0,0361
0,630	3,13	0,16	0,0256
0,625	3,10	0,13	0,0169
0,585	2,86	0,11	0,0121
0,590	2,89	0,08	0,0064
0,605	2,98	0,01	0,0001
0,615	3,04	0,07	0,0049
0,590	2,89	0,08	0,0064
0,570	2,77	0,20	0,0400
0,575	2,80	0,17	0,0289
0,605	2,98	0,01	0,0001
0,600	2,95	0,02	0,0004
0,605	2,98	0,01	0,0001
0,610	3,01	0,04	0,0016
0,610	3,01	0,04	0,0016

1) Déviation standard

sachant que N = 21

$$\bar{x} = 2,97 \text{ g \%}$$
$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum d^2}{N-1}} = \sqrt{\frac{0,4313}{20}} = 0,43 \text{ g \%}$$

2) Coefficient de variation

$$CV = 100 \times \frac{\sigma}{\bar{x}} = 16,1 \%$$

La valeur de σ obtenue en appliquant la formule :

$$\sigma = \frac{s^2}{N - 1}$$

conduit à une déviation standard égale à 0,48 g % et permet de calculer le coefficient de variation :

$$CV = 100 \times \frac{\sigma}{\bar{x}} = 16,1 \%$$

La reproductibilité est donc acceptable et bien supérieure à celle obtenue par la classique numération des colonies de mycobactéries. (2)

Il nous est surtout apparu que la reproductibilité dépendait non seulement de la qualité de la suspension microbienne mais aussi du mode de répartition des volumes de milieu ensemencé. Nous avons veillé tout particulièrement à ne pas laisser s'écouler le milieu à partir du col du flacon, car la culture qui se développerait à ce niveau à partir d'une gouttelette résiduelle, bénéficiant d'une aérobose extrêmement favorable, conduirait à un développement beaucoup plus intense et à une production d'anhydride carbonique incomparablement plus forte.

Dans le même ordre d'idées, les flacons doivent tous être placés en position verticale pendant toute la durée de la culture.

Les remarquables qualités de rapidité et reproductibilité de ce procédé nous ont permis d'étudier le rôle de certains facteurs et le comportement d'un grand nombre de souches vis-à-vis du Céthéxonium.

FACTEURS SUSCEPTIBLES DE MODIFIER LE COMPORTEMENT DES BACILLES TUBERCULEUX EXPOSÉS À L'ACTION DU CÉTHÉXONIUM

1 - NATURE DU MILIEU DE CULTURE DES SOUCHES

Nos essais ont porté sur des souches dont on définissait par ailleurs la résistance aux antibacillaires. Nous avons utilisé, pour des raisons pratiques, les suspensions bacillaires préparées à cet usage. Celles-ci ont tout d'abord été obtenues à partir de cultures de 10 à 15 jours sur milieu de JENSEN, puis par commodité, une subculture de 4 à 8 jours en milieu de YOUNG a été utilisée par la suite systématiquement (la teneur déjà fixée, à 1 mg/ml en bacilles étant néanmoins conservée).

Craignant que cette modification de protocole n'altère la signification

de nos premiers résultats, nous avons procédé, sur dix souches, à des essais comparatifs. En particulier, le vert malachite contenu dans le milieu de JENSEN ne potentialiserait-il pas l'activité du Céthéxonium ?

Nous constaterons qu'il peut parfois en être ainsi. TABLEAU N° 13 (5)

2 - RICHESSE DE L'INOCULUM EN BACILLES ET TEMPS D'INCUBATION

Afin de préciser l'influence que pouvait éventuellement exercer ce facteur, nous avons réalisé des suspensions de Mycobactéries titrant en mg/ml : 5.10^{-2} , 1.10^{-2} , 5.10^{-3} , 1.10^{-3} , 5.10^{-4} , 1.10^{-4} .

Des dosages journaliers, s'échelonnant du 5ème au 13ème jour, nous montrèrent que :

- Les droites correspondant aux différentes teneurs en bacilles sont pratiquement parallèles. De plus, la suspension 5.10^{-2} , pouvant être considérée comme le témoin 100 %, alors que 5.10^{-3} et 5.10^{-4} , seraient, respectivement, les témoins 10 et 1 %, les points s'alignent sensiblement sur une droite. Figure 4

- Pour une gamme donnée (T 100, T 10, T 1), les droites s'inscrivent pratiquement sur des parallèles, d'un jour sur l'autre, se décalant simplement de plus en plus vers les plus fortes valeurs en anhydride carbonique. (Nous nous trouvons donc bien dans la phase de croissance arithmétique). Figure 5

Ces faits expérimentaux traduisent, en conséquence, la large indépendance du procédé vis-à-vis de la richesse de l'inoculum et du temps d'incubation.

Il arriva même, par suite d'une impossibilité prolongée de lecture, que les flacons sertis, parvenus au temps optimum de croissance, soient placés à 4° durant 8 jours, alors qu'une série indentique était recommencée. Lors de la lecture simultanée des deux séries nous avons constaté que les résultats concordent sensiblement, ce qui indique donc que le temps de stockage n'altère pas les teneurs en anhydride carbonique. Les pertes en anhydride carbonique (perméabilité du caoutchouc, solubilité dans le milieu de YOUNG), s'effectuent proportionnellement aux pressions partielles du gaz et n'influencent guère le résultat final, les mesures étant comparatives.

3 - INERTIE BIOLOGIQUE DES MEMBRANES FILTRANTES

Sachant que les membranes recevaient parfois, lors de leur préparation, un surfactif destiné à améliorer les temps de filtration (24), nous avons recherché

COMPORTEMENT DE DIFFÉRENTES SOUCHES DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS,
EXPOSEES A L'EFFET DU CETHEXONIUM.

SOUCIES	POURCENTAGE DE SURVIVANTS EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN CETHEXONIUM (mcg/ml).			
	10	20	40	80
1 - OLIV.	75	75	60	45
2 - OLIV.	60	75	55	50
3 - H 37 RV	85	30	40	40
4 - SLI.	105	110	95	80
5 - OLIV.	110	110	60	50
6 - UR.	95	95	85	70
7 - BIS. (3)	95	110	75	35
8 - AUM.	85	70	70	30
9 - NAI.	85	90	90	50
10 - RODRI.	100	115	75	75
11 - GEORG. (1)	100	100	70	45
12 - ACHE.	120	80	120	70
13 - REIN.	90	60	65	110
14 - FOUC. (2)	150	100	170	50
15 - ALI. (2)	150	100	120	55
16 - PAULO. (3)	85	95	95	70
17 - MARI.	75	55	55	25
18 - SANA.	85	60	50	25
19 - FRAN.	100	90	75	50
20 - LACH.	50	45	45	45
21 - CHEMI.	70	65	60	85
22 - COULI.	100	100	90	100
23 - CHABA.	100	100	90	30
24 - PICA.	90	100	35	30
25 - BIAN.	100	100	100	40

SUIITE DU TABLEAU N° 13

SOUCHES			POURCENTAGE DE SURVIVANTS EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN CETHEXONIUM (mcg/ml).			
			10	20	40	80
26 - GARCI.	(4)	A	75	80	35	15
		B	90	85	75	35
27 - HILAI.	(4)	A	110	70	70	60
		B	70	70	80	80
28 - COURTE.	(4)	A	100	100	100	80
		B	100	100	100	80
29 - BELLI.	(4)	A	110	100	90	80
		B	80	100	80	70
30 - HOUS.	(5)	A	90	110	110	85
		B	90	90	100	70
31 - FERA.	(5)	A	90	100	80	45
		B	110	110	90	90
32 - H 37 RV			100	100	100	70
33 - CCURTE.			55	80	80	80
34 - MARCO.			90	90	90	60
35 - ABE.			80	75	70	75
36 - SIM.			90	100	50	50
37 - ROB.			100	100	100	50
38 - JEA.			110	110	80	80
39 - RIBEI.			90	100	100	70
40 - MART.			100	90	100	70

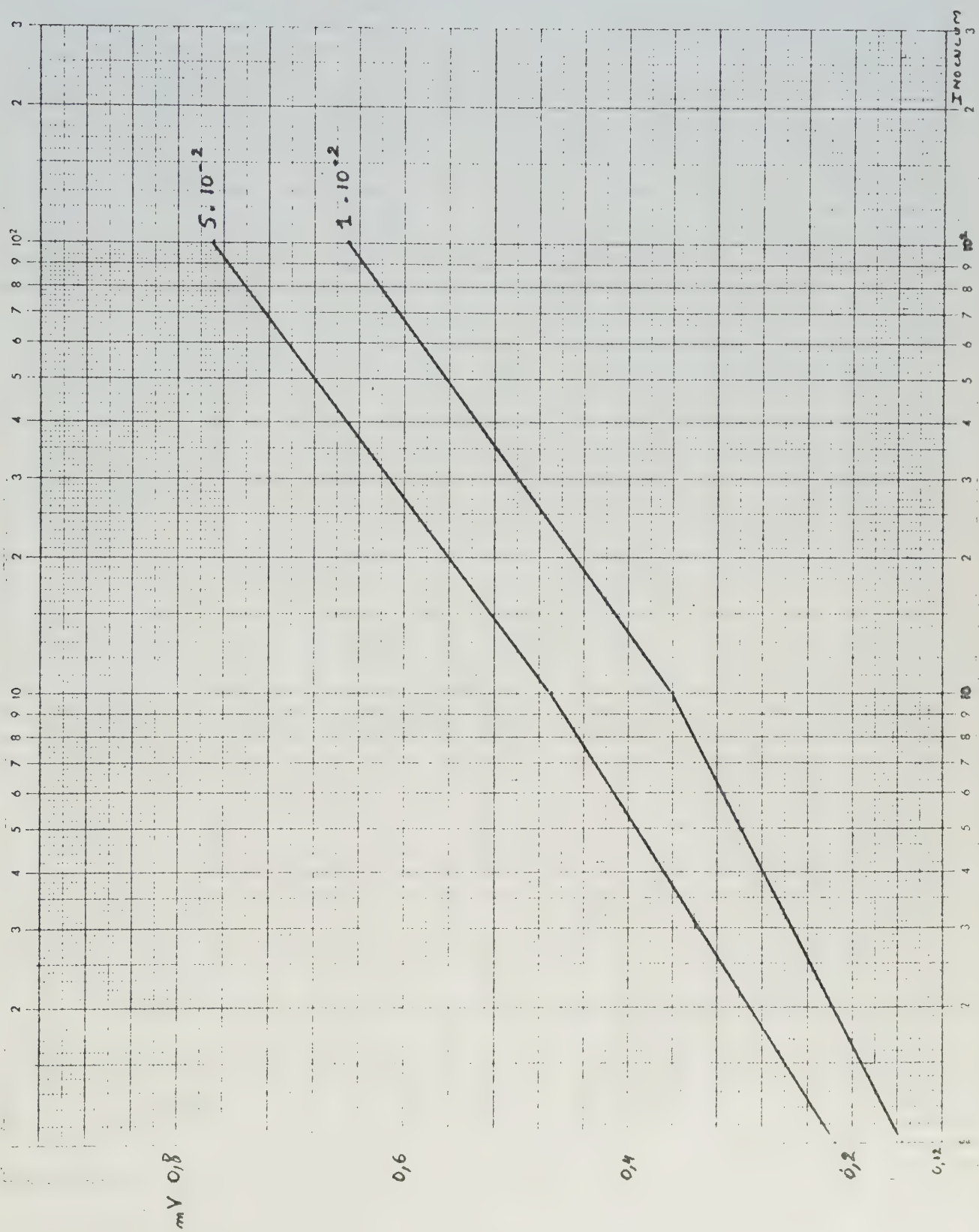


Figure 4 : Influence de la richesse de l'inoculum sur le comportement du *Mycobacterium tuberculosis* exposé à l'effet du Cétéxonium.

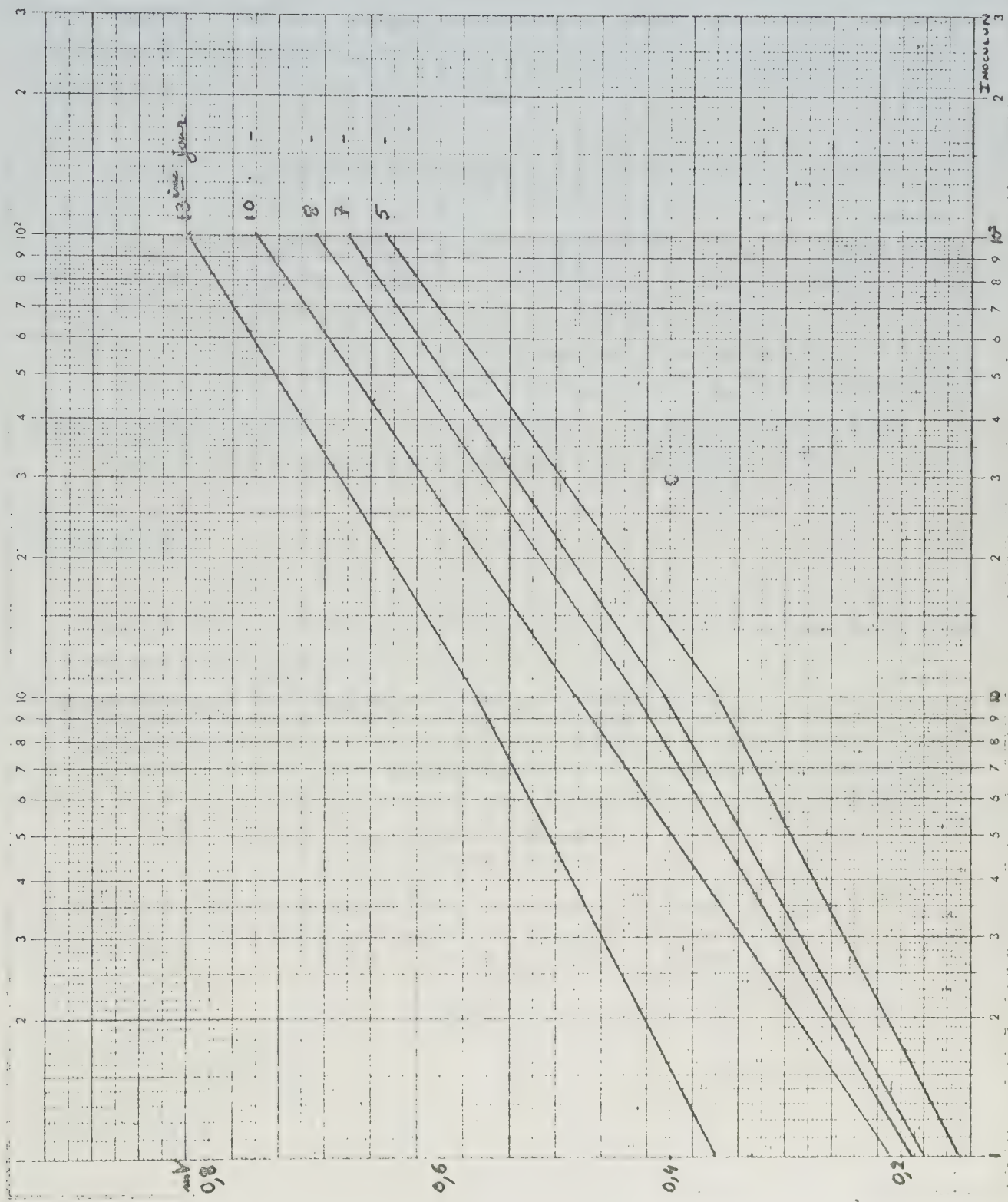


Figure 5 : Etude de la croissance d'une souche de *Mycobacterium tuberculosis* exposée à l'action du Céthéronium.

un éventuel effet tuberculostatique qui aurait pu se surajouter à celui du Céthéxonium, en cours de culture.

Nous avons donc comparé le comportement de suspensions mycobactériennes, certaines ayant été au contact, pendant 4 heures, avec une membrane, stérilisée par autoclavage à 110° pendant 20 minutes, servant de témoin ; l'appréciation de la croissance s'effectuant toujours par mesure de l'anhydride carbonique produit.

Aucune différence notable n'ayant été décelée, nous pensons que le fait d'autoclaver pour stériliser les membranes débarrasse celles-ci du surfactif introduit au cours de leur fabrication.

II) - INFLUENCE DU CETHEXONIUM RESIDUEL SUR LE DEVELOPPMENT DES MYCOBACTERIES

Les mycobactéries isolées au cours de la filtration des urines pouvant être soumises à l'action rémanente du Céthéxonium, nous avons étudié le comportement de 40 souches humaines récemment isolées de l'organisme et dont la sensibilité aux antibacillaires a été simultanément déterminée.

En mettant à profit le protocole de dosage de l'anhydride carbonique, une gamme de Céthéxonium (de 10 à 80 mcg/ml) a été utilisée à cet effet.

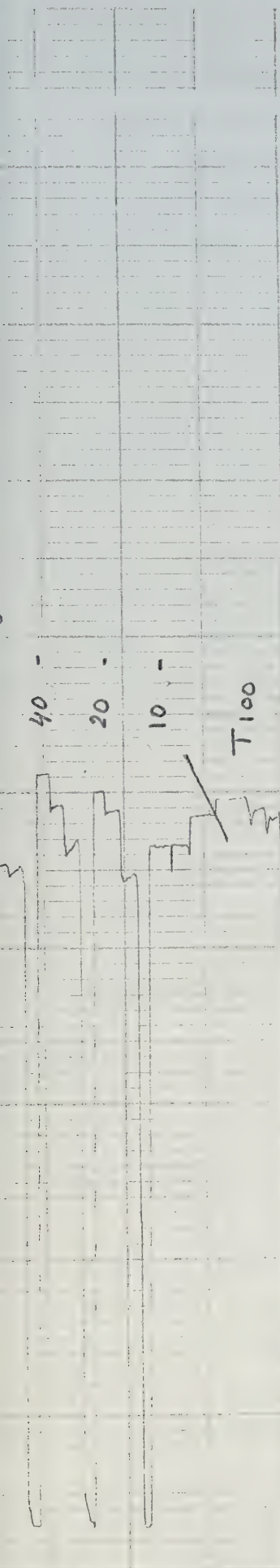
Les résultats obtenus sont consignés dans le TABLEAU N° 14.

COMMENTAIRES

(1) - Un tracé d'enregistrement est donné à notre exemple. Il illustre la croissance de la souche 11. Figure 6

Nous avons relevé les résultats suivants, exprimés en mV :

	ECHANTILLONS			MOYENNE	POURCENTAGE DE SURVIVANTS
	1er	2ème	3ème		
TEMOIN 1 %	0,11	0,11	0,11	0,11	
TEMOIN 10 %	0,22	0,20	0,24	0,22	
TEMOIN 100 %	0,38	0,43	0,43	0,41	
TEMOIN 100 % exposé à des concentrations croissantes en Céthéxonium :					
10 mcg/ml	0,41	0,42 ⁵	0,41	0,41	100
20 mcg/ml	0,41	0,41	0,41	0,41	100
40 mcg/ml	0,37	0,38	0,39	0,38	70
80 mcg/ml	0,34	0,35	0,37	0,35 ⁵	45



PAULOWIX 14/XII

Figure 8 : Etude du comportement d'une souche de Mycobacterium tuberculosis exposée à des concentrations croissantes de Céthéxonium. Influence de la dispersion sur la validité des résultats.

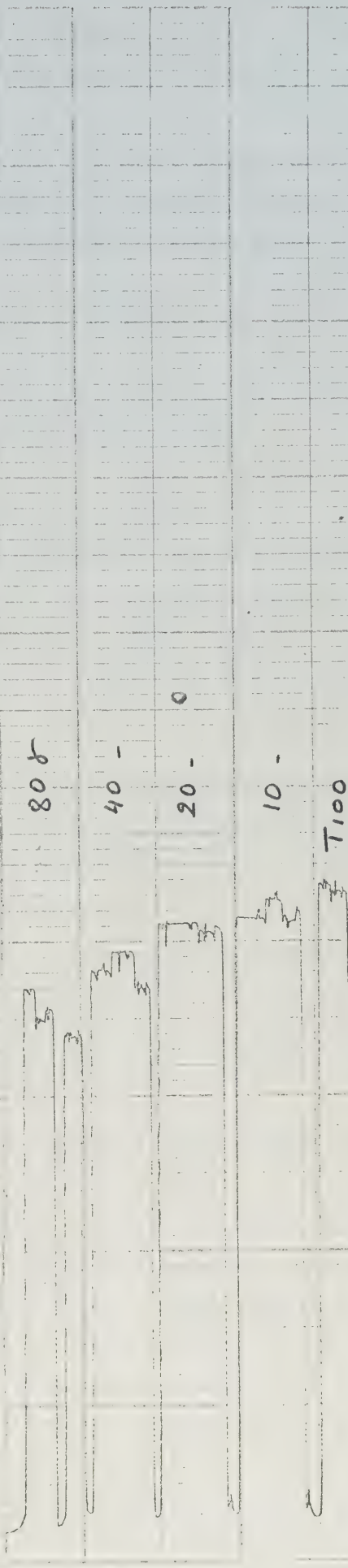


Figure 6 : Développement d'une souche de Mycobacterium tuberculosis en présence de concentrations croissantes de Céthéxonium.

GEORGETTE 4/XII

(2) - L'anomalie rencontrée avec les souches 14 et 15 où le développement en présence de Céthéxonium est bien supérieur à celui du témoin 100 %, pourrait s'expliquer par leur dépendance vis-à-vis du surfactif (comme ceci se produit parfois avec la streptomycine ou le tween 80).

Nous pensons qu'il s'agit simplement de souches à culture capricieuse, fournissant des suspensions particulièrement grossières, d'où des inoculum irréguliers. De surcroît, la culture extrêmement lente ne permit une analyse qu'après 26 jours (délai 3 fois supérieur au délai habituel). Enfin les subcultures ayant dégénéré, il ne nous fut pas possible de recommencer l'essai.

(3) - Le tracé des courbes de croissances intéressant les témoins 10 % et 100 % des souches 9 à 16 est rapporté sur la figure 7.

On notera tout particulièrement que :

- la pente des courbes est à répartition bimodale.

- entre 60 et 100 % une irrégularité de croissance des différents exemplaires d'une même concentration prend une importance considérable.

Ainsi, pour la souche 16, figure 8, les écarts maxima sont tels avec les concentrations de 20 et 40 mcg/ml qu'une différence minime de 0,2 mV correspond à plus ou moins 10 % de survivants.

(4) - Les 4 souches 26, 27, 28, 29 ont été essayées en milieu de Youmans auquel fut ajouté pour la série 1, avant filtration, et pour la série B, après filtration, le Céthéxonium. Nous voulions ainsi mettre en évidence une éventuelle rétention du surfactif par la membrane.

En réalité aucune différence significative n'est à rapporter. Cette expérience atteste cependant de la bonne fidélité de la méthode.

(5) - Cet essai porte sur l'influence du milieu de culture dans l'obtention de suspensions mycobactériennes.

Le vert malachite ne peut-il en particulier potentialiser l'action d'un tuberculostatique ?

Les 8 premières suspensions préparées (souches 1 à 8) le furent directement à partir du milieu de Jensen, puis réétudiées ultérieurement en procédant à une subculture en milieu de Youmans. Aucune différence significative ne fut enregistrée, les variations étant du même ordre qu'avec la souche 30 ; en considérant 2 cas

A : suspension issue directement du milieu à l'oeuf.

B : suspension obtenue par subculture en milieu de Youmans.

Avec la souche 31, le Céthéxonium (à 80 mcg/ml) ne se révéla nettement agressif que dans le premier cas. Ce fait isolé mériterait cependant d'être recherché sur un plus grand nombre de souches et, s'il se renouvelait, confirmerait notre hypothèse que le vert malachite, ~~entraîné en plus ou moins grande~~

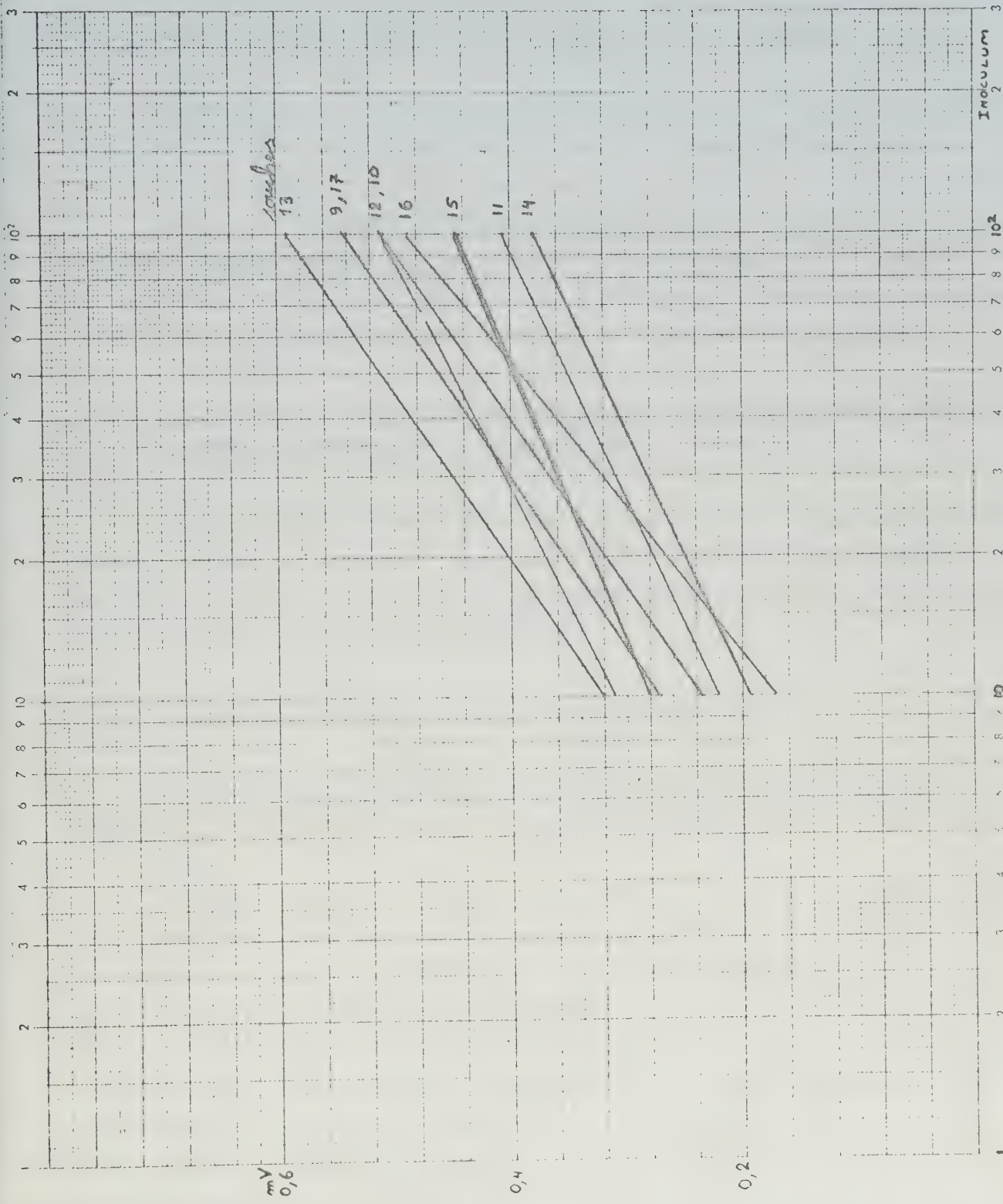


Figure 7 : Courbes de croissance établies à partir des témoins 10 et 100 et de 9 souches de *Mycobacterium tuberculosis*.

~~quantité lors de la récolte des colonies à la spatule,~~ peut potentialiser artificiellement l'action des tuberculostatiques.

En résumé, il apparaît que dans nos conditions de recherche du bacille tuberculeux dans les urines, décontaminées par le Céthéxonium, l'influence du surfactif résiduel sur la croissance ultérieure des mycobactéries est négligeable. Pratiquement cet effet est insensible jusqu'à 40 mcg/ml.

Cependant afin d'utiliser au mieux les ressources de la méthode décrite de mesure, il nous paraît indispensable de distribuer plus précisément les volumes ensemencés. L'appréciation du pourcentage de survivants n'en sera que plus fine.

Aussi pour nos dernières séries (souches 32 à 40) avons-nous utilisé des pipettes à usages unique, en polystyrène[✱], qui est un matériau non mouillable où l'écoulement des liquides s'effectue sans ménisque; en conséquence les écarts enregistrés pour une même concentration sont apparus moins importants.

III) - INCIDENCE DE L'EXPOSITION DES BACILLES TUBERCULEUX PRESENTS DANS L'URINE A L'EFFET ANTISEPTIQUE DU CETHEXONIUM.

Disposant ainsi d'une méthode permettant aisément d'apprécier quantitativement l'action du surfactif, nous avons voulu étudier le comportement de souches soumises aux conditions réelles de décontamination telles que nous les avons fixées dans notre protocole de recherche.

a) MODE OPERATOIRE

Des cultures de *Mycobacterium tuberculosis* sont pratiquée en milieu de Youmans, de telle manière que les suspensions titrent environ 1 mg/ml au bout de 4 à 6 jours.

On répartit ainsi, en tubes à centrifuger stériles, 1 ml de ces suspensions et on complète à 9 ml avec de l'eau distillée stérile.

La série A ne subit ni décontamination, ni centrifugation.

La série B subit seulement la centrifugation

(ces deux séries serviront de témoins de culture)

La série C reçoit une solution de Céthéxonium de manière à réaliser une concentration de 5.000 mcg/ml qui agira pendant 15 minutes.

Pour la série D le temps de contact est de 30 minutes.

Pour des raisons de commodité de lecture, les enregistrements graphiques sont anotés respectivement : T (témoin) 0 (zéro minute) 15 (15 minutes) 30 (30 minutes).

Les séries B, C et D subissent une double centrifugation en enceinte refroidie à

✱ pipettes 5 ml au 1/100ème

+ 4°C pendant 10 minutes :

- une première fois après 15 ou 30 minutes de contact avec le surfactif, puis le surnageant est éliminé.
- une seconde fois après que le précédent culot de centrifugation a été remis en suspension dans 20 ml d'eau distillée stérile.

Le culot de cette seconde centrifugation est finalement remis soigneusement en suspension dans 10 ml de milieu de Youmans, et constitue le témoin 100 %, à partir duquel, par dilution au dixième, on prépare pour chaque série un témoin à 10 % et 1 %.

L'ensemble de ces suspensions suit alors le processus habituel de culture et lecture.

Les résultats fournis par les cultures des 3 témoins permettent pour chaque série de tracer la courbe du développement mycobactérien et d'en comparer la qualité.

b) RESULTATS

Les résultats obtenus sont consignés dans le TABLEAU N° 14.
(la série A nous a permis d'établir la gamme de référence, mais nous nous sommes principalement attachés à comparer entre eux les développements des témoins 100 %).

TABLEAU N° 14

COMPORTEMENT DE ONZE SOUCHES DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS
SOUMISES A L'ACTION DU CETHÉXONIUM

SOUCHES	POURCENTAGE DE SURVIVANTS		
	Temps d'exposition au Céthéxonium (en minutes)		
	0 (6)	15 (c)	30 (p)
BIS.	80	4	3
OLIV.	80	6	2
HILAI.	120	40	30
COURTE. (1)	80	5	15
COULI.	100	12	4
H 37 RV	85	- (2)	12
SANA.	90	5	3
FRAN.	75	8	4
FERA.	110	5	2
HOUS.	80	6	5
RIBEI.	110	5	3

2 souches feront l'objet de remarques particulières, elles ont été notées (1) et (2).

Il ressort de cette étude, que même limité à 15 minutes, l'effet du Céthéxonium à la concentration de 5.000 mcg/ml nuit fortement au développement ultérieur des bacilles tuberculeux, puisqu'en moyenne moins de 10 % seulement survivent. Même si cette action apparaît moins défavorable que celle des agents chimiques "décontaminants" usuels (soude, acide sulfurique[⌘]) ce taux de survivants n'en demeure pas moins extrêmement faible. De plus cet effet est quasi général et s'exerce quelle que soit la sensibilité de la souche aux antibacillaires.

L'exemple fourni par la croissance de la souche FRANC. illustre cette constatation. (Figure 9 et 10) On note à cette occasion que la comparaison des suspensions de concentrations équivalentes (T 10 et T 1) ne présente guère qu'un intérêt limité au contrôle de la qualité du développement microbien.

Une comparaison quantitative rigoureuse aurait exigé un niveau de croissance bien supérieur, c'est-à-dire une incubation plus longue. Il eut fallu procéder à une double série de mesures : l'une précoce, pour la tranche 10 % et 100 %, l'autre plus tardive pour la gamme 1 et 10 %.

La première anomalie (1) signalée traduit la perte accidentelle d'une portion du culot de centrifugation. Lors des manipulations en effet, un fragment de liège assurant l'étanchéité du bouchon s'étant mêlé malencontreusement à la suspension, son élimination au cours du lavage entraîna la perte d'une partie du culot microbien.

La seconde anomalie (2) s'explique par le fait que le témoin 100 % n'offrit qu'une pousse médiocre, bien inférieure au point 10 % de la gamme de référence (figure 10), le culot de centrifugation n'ayant pas été lavé par inadvertance.

Il est par conséquent tout-à-fait impératif d'éliminer le surfactif par un lavage soigneux à l'eau distillée, bien que cette précaution ne soit pas toujours observée par tous les auteurs qui utilisent les surfactifs (TABLEAU N° 2).

Seuls les témoins 1 et 10 % cultivèrent néanmoins dans ces conditions car l'effet du Céthéxonium s'est trouvé atténué du simple fait de la dilution.

⌘ qui ne laissent guère subsister que 1 % des bacilles tuberculeux. (9)

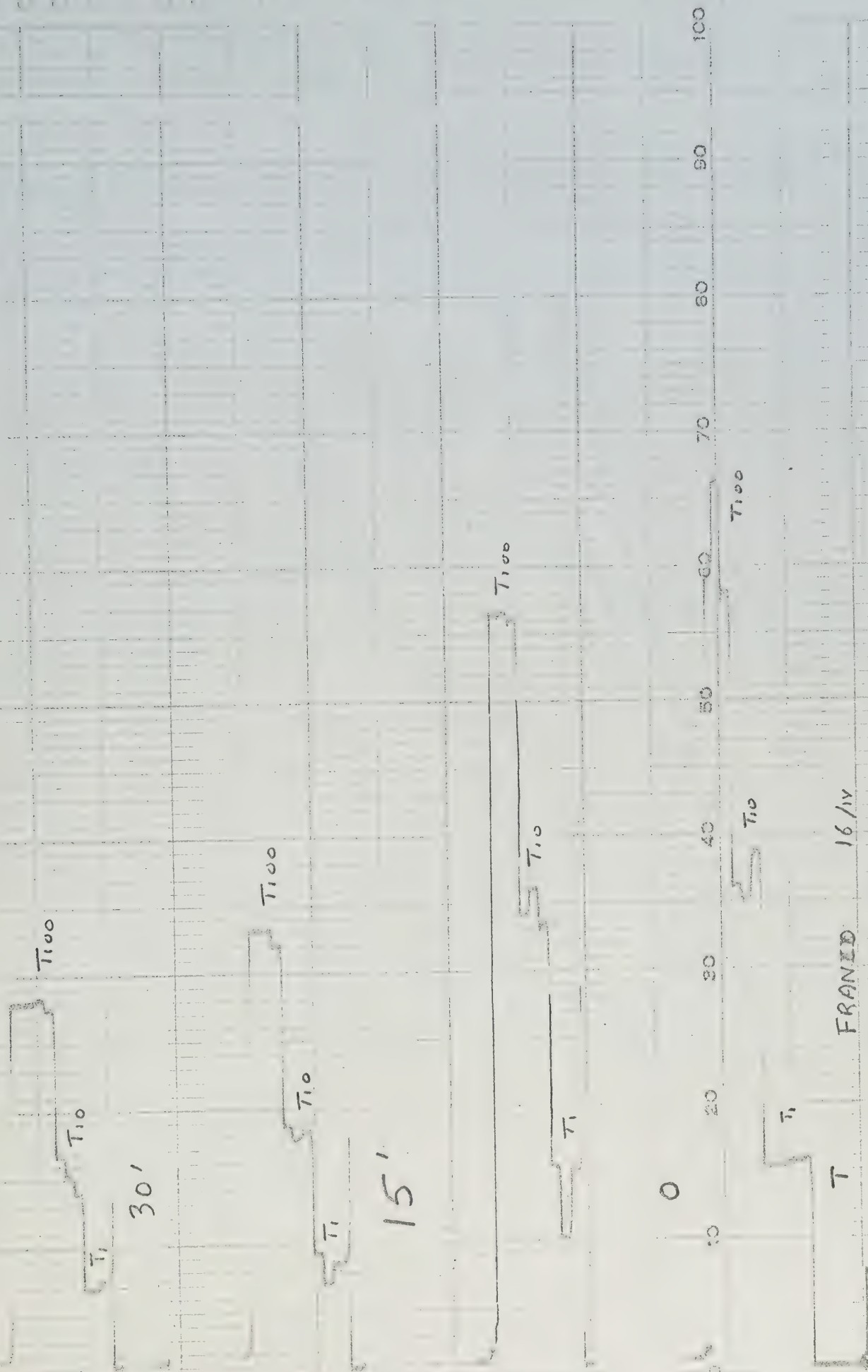


Figure 9 : Comportement d'une souche de *Mycobacterium tuberculosis* soumise à l'action du Céthyloxonium durant un temps variable.

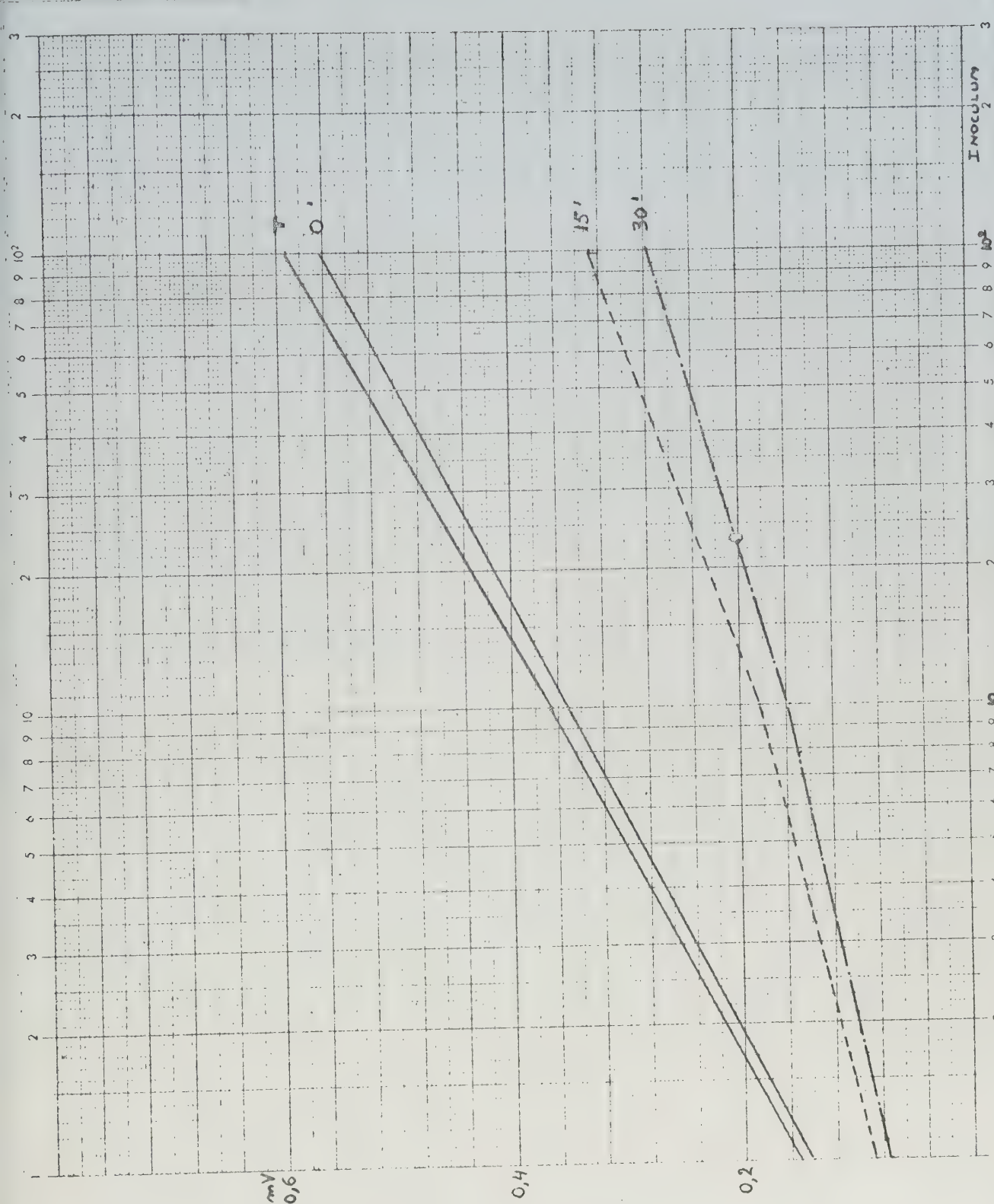
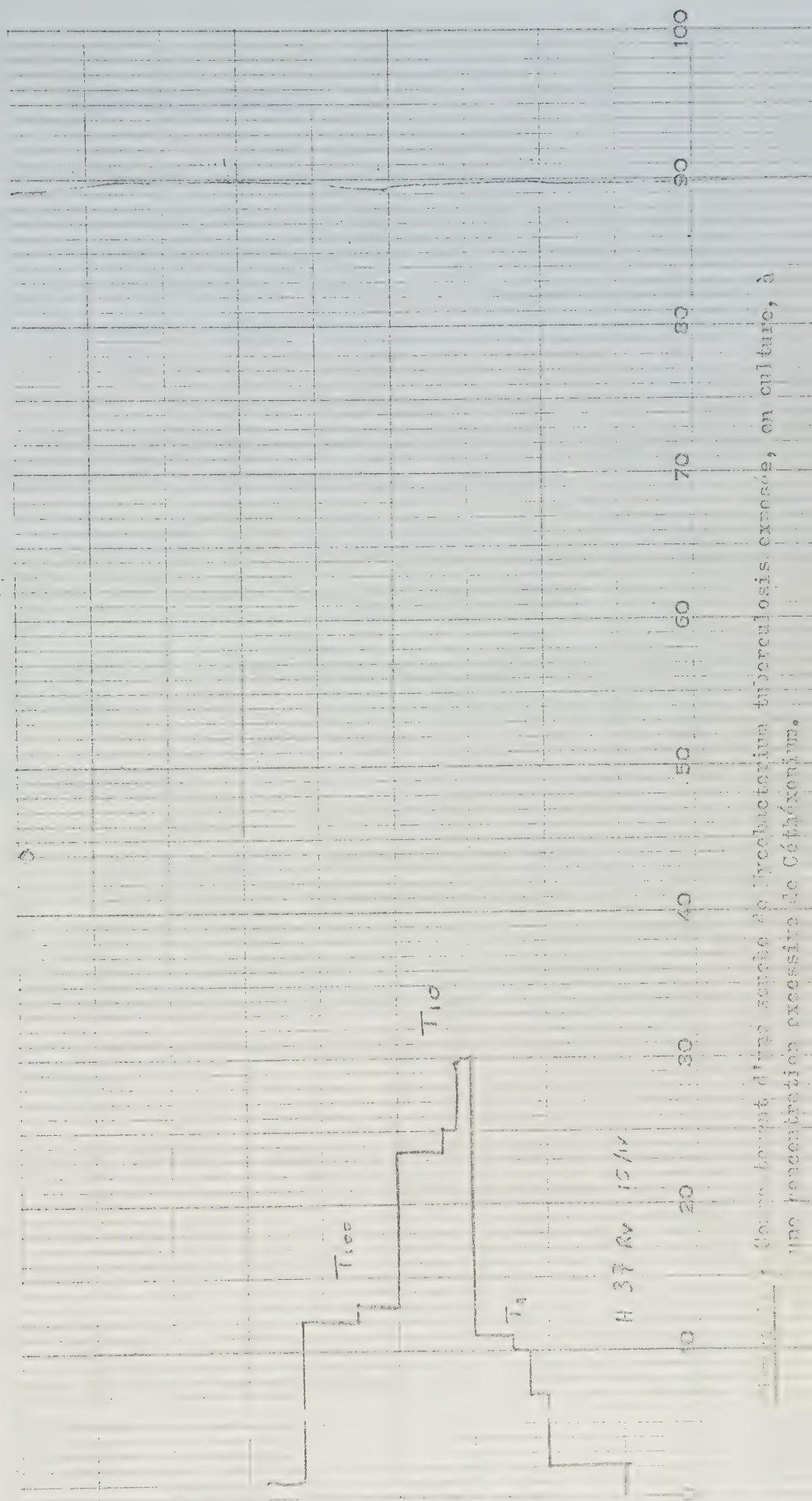


Figure 10 : Courbes de croissance d'une souche de *Mycobacterium tuberculosis* soumise à l'action du Cétuxonium durant un temps variable.



On ne trouve d'une seule de Mycobacterium tuberculosis exosée, en culture, à une concentration excessive de Cétuxonim.

CONCLUSIONS GENERALES

Au cours de cette étude qui nous a permis de décrire un protocole original d'isolement des bacilles tuberculeux éventuellement présents dans les urines au cours d'une tuberculose uro-génitale, nous avons mis à profit le caractère sélectif de la filtration sur membrane, et l'efficacité "décontaminante" d'un ammonium quaternaire, le Céthéxonium.

L'urine est privée des germes adventices après 30 minutes de contact à 37° au moyen d'une solution de Céthéxonium, puis filtrée sur une membrane d'acétate de cellulose présentant une porosité moyenne de 0,45 micron.

Après lavage à l'eau distillée, la membrane est découpée en 3 secteurs qui sont disposés à la surface de milieux de Jensen, Coletsos B et B0.

Nous avons tenu à préciser le rôle, l'intérêt ou l'incidence de certains temps du protocole envisagé.

I) - CHOIX DU DECONTAMINANT

Nous avons retenu le céthyl-diméthyl (hydroxy 2 - cyclohexyl) ammonium. Ce composé appartient à la classe des surfactifs cationiques. Son radical céthyl lui confère une activité bactéricide optimale qui s'exerce, en particulier, vis-à-vis des bactéries ne prenant pas la coloration de GRAM, Ces espèces sont précisément rencontrées avec une grande fréquence dans les infections rénales aiguës, elles peuvent donc masquer une tuberculose urogénitale en surinfectant cette lésion.

Nous avons, en outre, précisé la valeur de la concentration minimale bactéricide ou C.M.B. du composé vis-à-vis de dix souches de *Pseudomonas aeruginosa*. Cette bactérie, en effet, apparait comme la plus résistante de toutes avec une C.M.B. pouvant atteindre 1.800 mcg par millilitre.

En conséquence, nous avons utilisé tout au long de notre étude une concentration en Céthéxonium de 5.000 mcg par millilitre, seule susceptible de nous garantir une marge satisfaisante de sécurité.

Dans ces conditions, le taux de contamination est globalement faible, seulement un pour cent des tubes ensemencés avec les fractions de membrane filtrante se trouve contaminé bien que les échantillons d'urines soient parfois pollués par plus de 10^5 germes par millilitre.

Cette constatation résulte de la mise en culture systématique de ces échantillons ; la numération de leur flore microbienne usuelle a été facilitée par l'utilisation d'une anse de platine calibrée qui permet de déposer un volume connu d'urine à la surface d'un milieu de gélose trypticase soja. Du nombre de colonies apparues après 24 heures d'incubation à 37° on peut apprécier la bactériurie initiale.

II) - CHOIX DU MILIEU DE CULTURE

Connaissant la mauvaise conservation des milieux gélosés au sang, tel celui de TARSHIS, nous avons préféré utiliser les milieux à l'oeuf, réputés plus sensibles, bien que les mycobactéries s'y développent plus lentement.

La mise en culture systématique des échantillons d'urine sur milieux de Jensen, Coletsos B et B0 nous a permis d'augmenter sensiblement les chances d'y déceler des bacilles tuberculeux.

A cet égard, celui de Coletsos B nous a fourni régulièrement le plus grand nombre de résultats positifs ; mais seule l'utilisation conjointe de ces 3 variétés de milieux à l'oeuf permet de révéler l'infection mycobactérienne dans plus de 50 % des cas en se limitant à une seule recherche.

III) - INTERET DE RECHERCHES REITEREES

En limitant la recherche du bacille tuberculeux à un seul échantillon nous avons constaté que l'infection n'était décelée seulement qu'une fois sur deux chez des sujets non traités et présentant une lésion en évolution.

Ce fait doit pouvoir s'expliquer tant par la rareté des germes que par l'irrégularité de leur élimination. Nous avons pu en effet montrer, en cumulant les résultats fournis par les trois milieux précités, que sur dix recherches appliquées à des échantillons provenant d'un même sujet, quatre demeurèrent vaines et trois ne fournirent que des cultures médiocres limitées à de rares microcolonies.

IV) - INCIDENCE DES ELEMENTS FIGURES DE L'URINE SUR LA FILTRATION

L'existence d'une lésion tuberculeuse urogénitale s'accompagne pour 88 %

de nos observations d'une leucocyturie supérieure à 10.000 éléments par millilitre.

Le temps de filtration du volume soumis à l'analyse (50 millilitres) est indépendant du nombre de leucocytes, du moins jusqu'à 100.000 par millilitre et est en moyenne de quatre minutes trente.

Plus gênante est la présence inconstante de certains métabolites qui, réagissant avec l'ammonium quaternaire, produisent un épais précipité susceptible de contrarier la filtration. Le rôle des mucopolysaccharides a été évoqué.

V) - TENEUR EN CETHÉXONIUM DE LA MEMBRANE APRES FILTRATION

Considérant l'abondance de certains précipités retenus à la surface de la membrane, nous avons été conduit à déterminer la concentration résiduelle de Céthéxonium sur cette membrane.

Les résultats obtenus par voie microbiologique s'accordent avec l'évaluation colorimétrique, laquelle fait intervenir la propriété qu'ont les ammoniums quaternaires de donner, en milieu alcalin, avec certains colorants anioniques, des combinaisons colorées extractibles par les solvants organiques. L'intensité de la coloration est appréciée au spectrophotomètre sous une longueur d'onde de 505 nanomètres. Dans ces conditions les plus fortes teneurs retrouvées n'exèdent pas 3 microgrammes.

Compte tenu des concentrations en Céthéxonium auxquelles seront soumis les bacilles tuberculeux dans les échantillons d'urine, nous avons apprécié, sur des souches récemment isolées de l'organisme, l'effet du surfactif, tant immédiat qu'en cours de culture.

La croissance des mycobactéries a été suivie par dosage de l'anhydride carbonique produit au cours de la multiplication bactérienne, dosage effectué à l'aide d'un analyseur en infra-rouge.

Le coefficient de variation de cette méthode a été apprécié et s'est montré de l'ordre de 16 %.

Il ressort de cette étude que si l'effet du surfactif résiduel est négligeable en cours de culture, il n'en est pas de même lors d'un traitement décontaminant. Ce traitement même limité à 15 minutes à 37° ne laisse subsister qu'une proportion de mycobactéries viables inférieure à 10 %.

De l'ensemble des éléments recueillis, nous retiendrons que ces résultats obtenus sont néanmoins plus favorables que ceux fournis par les procédés jusqu'alors en usage.

Cependant cette recherche doit toujours être conduite en gardant présents à l'esprit non seulement le caractère insidieux de cette forme d'infection mais aussi les difficultés de sa mise en évidence et les conséquences néfastes d'une réponse faussement négative, apparemment rassurante.

Aussi souhaitons-nous que cette étude puisse rendre quelque service aux cliniciens souvent désabusés par les faibles possibilités que leur offre habituellement l'examen bactériologique dans la découverte ou la confirmation d'une tuberculose uro-génitale.

A cet égard, la possibilité de découvrir des mycobactériophages, témoins de l'infection (45), dans les liquides biologiques, nous paraît constituer une intéressante hypothèse de travail qu'il conviendrait de développer.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

- 1 - R.E. BEAM et G.P. KUBICA : Stimulating effects of anhydrid carbonic in the primary isolation of tubercle bacilli on agar containing medium.
Amer. J. clin. Pathol. 1968, 50, 395
- 2 - O. BERCEA, V. BOGDANESCU, S. MARCIAN et N. BONIOCAT : The disproportionality between colony count and dilution of the inoculated suspension in quantitative culture of Mycobacterium tuberculosis.
Tubercle 1968, 49, 310
- 3 - J. BETHOUART : Contribution à l'étude d'une nouvelle méthode d'isolement des bacilles tuberculeux, à partir des produits biologiques, par l'emploi des sels d'ammoniums quaternaires.
Thèse Pharmacie soutenue à Lille en 1957
- 4 - K.J. BIRN : Blood medium for the isolation of tubercle bacilli.
Brit. vet. 1965, 121, 437
- 5 - H.F.F. BLASCHKE et A. BELING : Ergebnisse der Filtration zum Nachweiss von Tuberkelbakterien durch Membranfilter.
Beitr. Klin. Tuberk. Dtsch. 1964, 129, 46
- 6 - J. BRETTEY : Une nouvelle méthode de mesure de la résistance des mycobactéries.
Bull. Acad. Nation. Méd. 1970, 154, 95
- 7 - J.S. CHAPMAN : A typical mycobacteria infections : pathogenesis, clinical manifestations and treatment.
Med. Clin. N. Amer. 1967, 51, 503
- 8 - R. CHARONNAT, M. MIOCCQUE et J. YONGER : Détection des ammoniums quaternaires dans le lait d'alimentation.
Ann. pharm. franç. 1957, XV, 673
- 9 - P.J. COLETOS : 1) Etude des facteurs extrinsèques de Mycobacterium tuberculosis rendant alléatoire sa culture in vitro.
2) Etude des facteurs intrinsèques de Mycobacterium tuberculosis expliquant l'état de quiescence et les échecs de culture sur milieux usuels.
Ann. Inst. Pasteur Paris 1959, 97, 135, 147
290, 306

- 10 - P.J. COLETSOS : 2) Milieux et modalités de culture adaptés à la réanimation et à la multiplication in vitro de *Mycobacterium tuberculosis*.
Ann. Inst. Pasteur Paris 1960, 99, 475, 495
- 11 - J.A. CSERNUS, M. JOOS, J. VAGANY, (O.) HEUER et J. BALINT : Uber die bakteriologischerfasste inapperzepte Urogenital Tuberkulose.
Praxis d. Pneumol. Dtsch. 1970, 24, 24
- 12 - E. DARZINS : The bacteriology of Tuberculosis.
Oxford University 1958, Press, London
- 13 - J. DEBRUYNE : Bactériologie et classification des infections humaines à mycobactéries.
G. M. de France 1971, 78, 1305
- 14 - P. DEUTICKE et H. HASCHEK : Uber Nierentuberkulose.
Der Urologe 1965, 46
- 15 - B. DEVULDER : Coloration des b.a.a.r. par la technique de Tan Thiam Hok modifiée.
Ann. Inst. Pasteur Lille 1963, 14, 229
- 16 - DI FERRANTE : The measurement of urinary mucopolysaccharides.
Anal. Biochem. 1967, 21, 98
- 17 - A. DOGNON : Concentration et séparation des microorganismes par les mousses.
Bull. Soc. Chimie Biol. 1941, XIII, 249
- 18 - A. DOGNON, A.P. PERRET et J. VALEYRE : Un mode opératoire simple d'enrichissement pour la recherche du bacille de Koch.
Rev. Tuberc. Paris 1960, 24, 697
- 19 - B. DOTTORI : Contribution à l'étude des méthodes d'isolement des mycobactéries à partir des produits pathologiques par l'emploi de différents sels d'ammoniums.
Thèse Médecine soutenue à Lyon en 1961
- 20 - J. DUMAS : Bactériologie médicale.
Paris Edit. Médicales Flammarion 1951 (révision annuelle), 592
- 21 - R.R. DURAND : La pollution des eaux naturelles par les détergents et l'influence de la structure moléculaire sur biodégradabilité.
Chimie et Ind. 1965, 94, 345
- 22 - EIRLICH : Application of membrane filters.
Adv. appl. Microbiol. U.S.A. 1960, 95
- 23 - D.R. FABER : Idiopathic unilateral renal hematuria associated with atypical acid-fast bacillus : Battey type - Cure by partial nephrectomy.
J. Urol. 1965, 93, 435-

- 24 - W.K. FISCHER : Methodische Hinweise und Fehlermöglichkeiten bei der
Untersuchung membranfiltrierter wässriger Lösungen.
Zeitschrift analyt. Chemie 1967, 116
- 25 - G. GINSBURG, E. SCHENKEL et P. NIKLON : Isotopenneurographie und
Szintigraphie bei der Nierentuberkulose.
Z. Urol. Nephrol. Dtsch. 1969, 62, 677
- 26 - Ch. GERNEZ - RIEUX, A. TACQUET, B. DEVULDER et J. DEBRUYNE : Les mycobac-
térioses humaines. Méthode actuelle du diagnostic bactériologique.
Aspects cliniques, thérapeutiques et épidémiologiques.
XVIème Congrès National de la Tuberculose et des Maladies respira-
toires. BORDEAUX 1970, 1
- 27 - H.N. GLASSMAN : Surface agents and their application in bacteriology.
Bacteriol. Rev. 1948, 12, 105
- 28 - R.L. GODFREY et D.G. JAMISON : The isolation of tubercle bacilli from
pathological specimens contaminated with coliform organisms.
Tubercle London 1964, 45, 374
- 29 - R.B. GRIEVES et WANG SHING-LIN : Foam separation of Escherichia coli with
a cationic surfactant.
Biotechnol. and Bioeng. U.S.A. 1966, 8, 323
- 30 - H. GRUFT : Nalidixic acid as decontaminant in Löwenstein-Jensen medium.
J. Bact. 1965, 90, 829
- 31 - L.D. HALEY et R. ARCH : Use of Millipore membrane filter in the diagnostic
tuberculosis laboratory.
Amer. J. clin. Pathol. 1957, 27, 117
- 32 - P. HAUDUROY : De l'hétérogénéité des populations bactériennes.
Path. Microbiol. Basel 1965, 28, 602
- 33 - P. HAUDUROY : Etat actuel du germe Mycobacterium.
Arch. Inst. Pasteur Tunis 1966, 43, 331
- 34 - G.D. HSIUNG et L.D. HALEY : A comparative study in the isolation of Mycobac-
terium tuberculosis on artificial media and embryonated eggs.
Amer. review Tubercul. 1954, 70, 912, 915
- 35 - M.H. HUGHES : Pyruvic acid egg medium for tubercle bacilli.
J. Clin. Pathol. G.B. 1966, 10, N° 1 - 73 - 5
- 36 - E.H. KASS : Bacteria.
Amer. J. Med. 1955, 18, 764
- 37 - E.H. KASS : Bacteria and the diagnosis of infections of the urinary tract.
Lab. Invest. U.S.A. 1960, 9, 110

- 38 - M. KENNEY, J.K. LATTIMER et M. GOLDMAN : Renal Tuberculosis.
Amer. Rev. Tuberc. 1954, 70, 149
- 39 - M. KENNEY, A.B. LOECHEL et F.J. LOVELOCK : Urine cultures in tuberculosis.
Amer. Rev. resp. Dis. 1960, 82, 564
- 40 - S. LAMBIN, A. GERMAN, C. CARRERE et J. BERNARD : Influence de diverses substances antiseptiques sur la respiration bactérienne.
Ann. Pharm. Franç. 1957, 15, 273
- 41 - A. LAMENSANS et J. BRETEY : Sur une méthode de contrôle rapide des préparations de B.C.G.
Ann. Inst. Pasteur Paris 1967, 112, 342
- 42 - J.K. LATTIMER : Renal tuberculosis.
New Engl. J. Med. 1965, 273, 208
- 43 - G. LELUAN : Activité bactéricide de divers antiseptiques à l'égard de *Pseudomonas aeruginosa*.
Thèse Pharmacie (Etat) soutenue à Paris en 1966
- 44 - V. LORIAN : Comparison of *Mycobacterium tuberculosis* culture on agar and Löwenstein.
Appl. Microbiol. U.S.A. 1967, 15, 1202
- 45 - E. MANKEIWICZ et M. LIIVAK : *Mycobacteriophages* isolated from human sources.
Nature 1967, 216, 485
- 46 - J. MARKS : Culture media for *Mycobacteria*.
Lab. Pract. G.B. 1965, 14, N° 6 - 716 - 8
- 47 - J. MARTIN et J. BADIN : Etude préliminaire d'une méthode d'estimation turbidimétrique des séromucoïdes sanguins.
Ann. Biol. Clin. 1957, 15, 675
- 48 - G. MARTINOTTI, G. PATERLINI et A. SOSSO : La tubercolosi delle vie urinarie allo stato attuale.
Lotta. Tuberc. Ital. 1968, 38, 105
- 49 - E.M. MEDLAR : Renal tuberculosis.
J. Urol. 1949, 61, 1078
- 50 - M. MUFTIC : Characteristic changes in *mycobacterium tuberculosis* induced by some tensides (surface-active agents).
Tubercle London 1969, 50, 305
- 51 - M. MUFTIC et U. REDMANN : Isolierte Agarbestandteile, die wachstumschemend auf *Mycobacterium tuberculosis* wirken.
Z. med. Mikrobiol. Immuno. Dtsch. 1967, 153, 228
- 52 - K. MURATA : A method for turbidimetric measurement of heparin : its application to the estimation of heparin in aortic tissue.
Experientia 1964, 20, 589

- 53 - A. NELLES et H.M. MOBIUS : Untersuchungen über eine Vorbehandlungs Methode mit Detergentien zur Kultivierung von Tuberkelbakterien aus Untersuchungsmateriel.
Machr. tsh. Dokpf. 1968, 313
- 54 - J. OUDAR, J. JOUBERT, J. VIALIER, F. CAILLERE et P. GORET : Les mycobactéries atypiques chez les animaux. Leur éventuelle transmission à l'homme.
La protection de la vie et de la santé. 1966, 7, 780
- 55 - C.M. PELIMAN et E.H. RUNYON : The significance of mycobacteria other than tubercle bacilli in the urine.
Amer. Rev. resp. Dis. 1964, 90, 243
- 56 - L.F. PRESCOTT et D.E. BRODIE : A simple differential stain for urinary sediment.
Lancet G.B. 1964, 2, 940
- 57 - E.H. RUNYON : The recognition and characterization of pulmonary mycobacterial pathogens other than tubercle bacilli : a review.
Tuberculose Istanbul Sept. 1959
Bull. Un. Intern. Tuberc. 1959, 29, 396
- 58 - C.A. ST HILL et J.G. GOW : Investigation into the isolation of Mycobacterium tuberculosis from urine.
Brit. J. Urol. 1966, 38, N° 2 - 163 - 170
- 59 - A. SCHMIEDEL : Méthode de traitement préliminaire des échantillons en vue de culture.
Bull. Un. Intern. Tuberc. 1966, 38, 67
- 60 - H.W. CHHULER : Rezidivkäufigkeit der Urogenitaltuberkulose.
Dtsch. Geselsch. Urol. Berlin 1968, 22
- 61 - SIKAND, RANGA et RAO : A simple pretreatment technique for sputum comprising the use of a combination of Pancreatin and Cetavlon for the routine cultivation of tubercle bacilli.
The indian Jour. of Tub. 1958, IV, 76
- 62 - SVARTZ, J. MALMBERG et J. WASSERMAN : Renal tuberculosis.
Acta. path. microbiol. scand. 1958, 44, 213
- 63 - A. TACQUET, F. TISON et G. MARTIN : Etude de différents procédés d'épuration des produits pathologiques et milieux de culture pour l'isolement de mycobactéries.
Ann. I. P. L. 1962, 13, 57
- 64 - A. TACQUET, M.T. PLANCOT, F. TISON, P. ROOS et B. DEVULDER : Les mycobactéries scotochromogènes.
Réunion de la Commission de Bactériologie et d'Immunologie de l'Union Internationale contre la Tuberculose.
Paris 4 - 6 juillet 1966
Bull. Un. Intern. Tuberc. 1967, 39, 39

- 65 - M.S. TARSHIS : Blood media for the cultivation of *Mycobacterium tuberculosis*.
Amer. J. clin. Pathol. 1951, 21, 101
- 66 - M. TEITEL, G.H. LAMBERTSON et A.L. FLORMAN : Filtration of urine for quantitation of cells and casts.
Amer. J. Dis. Child. 1964, 108, 19
- 67 - M.W. TELLER, E.C. BURK, J.W. ROSEVEAR et B.F. Mc KENZIE : Urinary excretion of acid mucopolysaccharides in normal children and patients with gargoylism.
J. Lab. clin. Med. 1962, 59, 95
- 68 - M.W. TELLER : Urinary excretion patterns of individual acid mucopolysaccharides
Nature 1967, 1132
- 69 - C.J. TIETZ : Nachweis von Tuberkelbakterien durch Filtration.
Wien. med. Wochschr. 1949, 5115 2, 613
- 70 - F. TISON, B. DEVULDER : Techniques actuelles d'isolement et d'identification des mycobactéries.
Path. Biol. 1965, 13, 458
- 71 - F. TISON, B. DEVULDER, P. ROOS et A. TACQUET : La décontamination des produits pathologiques en vue de la culture des mycobactéries, étude comparative des techniques actuelles.
Ann. Inst. Pasteur Paris 1967, 112, 372
- 72 - V.N. TKACHUK : Tuberculose de l'appareil urinaire chez les personnes âgées.
Urol. Nefrol. S.S.S.R. 1967, 32, 17
- 73 - J.C. TORLOTIN : Application des membranes filtrantes au contrôle de stérilité des solutés massifs et des nécessaires à perfusion.
Ann. pharm. franç. 1967, 25, 467
- 74 - J.C. TORLOTIN : L'examen cytobactériologique des urines en pratique courante.
Ann. Biol. clin. 1970, 28, 103
- 75 - D.R. TRIGER et J.W. SMITH : Survival of urinary leucocytes.
J. clin. Pathol. G.B. 1960, 19, 443
- 76 - (E.) UEHLINGER : Die pathologische Anatomie der hämatogenen Tuberkulose.
Schweiz. med. Wschr. 1967, 97, 1523
- 77 - J. VIALIER et J. AUGAGNEUR : Traitement par les sels d'ammoniums des produits pathologiques pour l'isolement du bacille tuberculeux.
Ann. I. P. 1955, 88, 391, 393
- 78 - J. VIALIER, R.M. CAYRE et J. AUGAGNEUR : Utilisation du céthyl-méthylcyclohexanol ammonium pour le traitement des produits pathologiques souillés avant leur ensemencement pour culture de Mycobactéries.
Ann. Biol. clin. 1962, 20, 143
- 79 - J. VIALIER, Ch. MARET, R.M. CAYRE et J. AUGAGNEUR : Valeur comparée de la culture et de l'inoculation au cobaye pour la mise en évidence du bacille tuberculeux dans les produits pathologiques humains.
Ann. Biol. clin. 1966, 24, 213

- 80 - L.G. WAYNE : Cultivation and visualization of Mycobacteria molecular filter membranes.
J. Bacteriology U.S.A. 1955, 69, 1, 92
- 81 - L.G. WAYNE, I. KRASNOV et G. KIDD : Finding the "hidden positive" in tuberculosis eradication programs.
Amer. Rev. resp. Dis. 1962, 86, 537
- 82 - L.A. WEED, A.G. KARLSON, J.C. IVINS et R. M. MILLER : Symposium on Saprophytic acid-fast bacilli in lesions simulating tuberculosis.
Proc. Staff. Meet. Mayo. Clin. 1956, 31, 238
- 83 - G. WRIGHT et W.L. MALIMANN : Method for staining acid-fast bacilli on the membran filter.
Amer. rev. resp. Dis. 1963, 87, 432
- 84 - L. ZADOR : Laterzeit der urogenitalen Tuberkulose nach "Primo infection".
Urologe Dtsch. 1969, 8, 15
- 85 - R. ZSIGMONDY et W. BACHMANN : Membranfilter.
Z. anorg. v. allgem. Chem. 1918, 103, 119

